

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

MENTION « CHIMIE INDUSTRIELLE »

PAR

TEWFIK SAID SAADALLAH

PHARMACIEN-CHIMISTE



1^{re} THÈSE, *ACTION DU FERMENT BULGARE
SUR LES DIFFÉRENTS SUCRES*

2^e THÈSE, *Propositions données par la Faculté*

Soutenues le

Juin 1930 devant la Commission d'examen

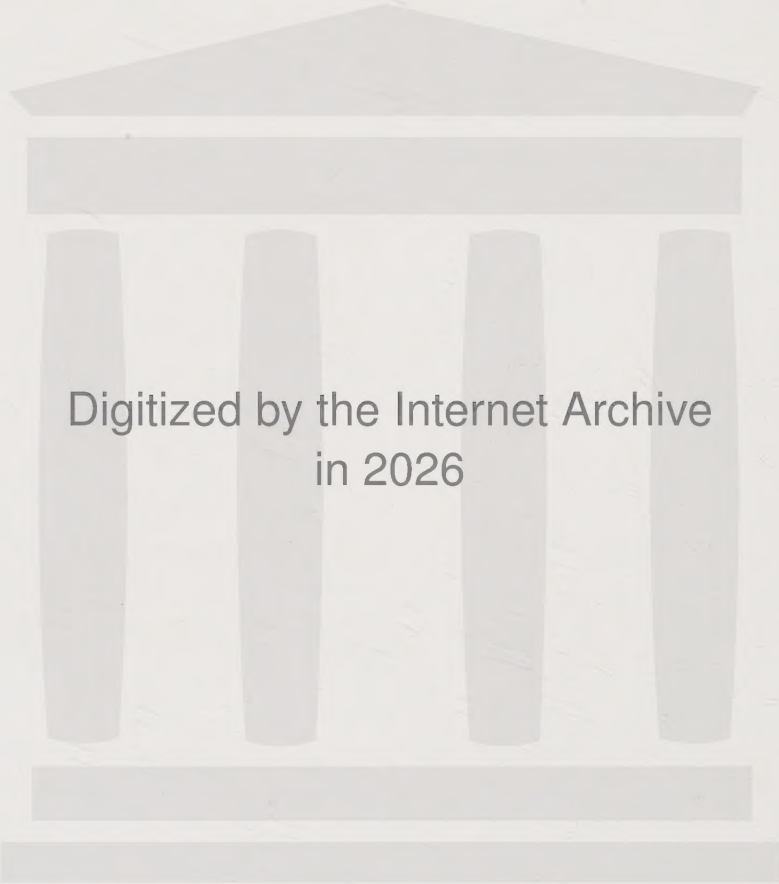
MM. H. CARDOT, *Président*
C. FROMAGEOT
E. BACHRACH

LYON
EDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE
DE L'UNIVERSITÉ

1930



LE FERMENT BULGARE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
MENTION « CHIMIE INDUSTRIELLE »

PAR

TEWFIK SAID SAADALLAH

PHARMACIEN-CHIMISTE

1^{re} THÈSE, *ACTION DU FERMENT BULGARE
SUR LES DIFFÉRENTS SUCRES*

2^e THÈSE, *Propositions données par la Faculté*

Soutenues le Juin 1930 devant la Commission d'examen

MM. H. CARDOT, *Président*
C. FROMAGEOT
E. BACHRACH

LYON
EDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE
DE L'UNIVERSITÉ

1930

UNIVERSITÉ DE LYON — FACULTÉ DES SCIENCES



Doyen :

M. GRIGNARD, O. I, P. N., Membre de l'Institut, Chimie générale.

Assesseur :

M. VANEY, I, .

Professeurs honoraires :

MM. VESSIOT, O. I;
GÉRARD, O. I, C; RIGOLLOT, I;
VAUTIER, I; LE VASSEUR, I;
OFFRET, I, ;
COUTURIER, I, .

Professeurs titulaires :

MM. GRIGNARD, O. I, P. N., Membre de l'Institut, Chimie générale.
KOEHLER, O. I, Correspondant de l'Institut, Zoologie.
DULAC, I, Calcul différentiel et intégral.
MASCART, I, Astronomie physique.
SIRE, I, Mécanique rationnelle et appliquée.
MEUNIER, I, Chimie industrielle.
BEAUVÉRIE, I, Botanique.
THOVERT, I, Physique.
CARDOT, Physiologie générale et comparée.
VANEY, I, Zoologie.
LONGCHAMON, Minéralogie théorique et appliquée.
LOCQUIN, I, Chimie générale.
ROMAN, I, Géologie.

Professeurs titulaires (sans chaire) :

MM. DOUIN, Botanique.
DEJARDIN, Physique.
LEMARCHANDS, I, Chimie industrielle.
EYRAUD, Mathématiques.

Maîtres de Conférences et Chargés de Cours complémentaires :

MM. AUMÉRAS, Chimie physique.
FROMAGEOT, Chimie agricole.
BONNET, I, Zoologie appliquée et Zootechnie.
MAYET, I, Anthropologie.
PELOSSE, I, Sériciculture.
DONCIEUX, I, P. C. N. supérieur.
SEYEWETZ, I, Matières colorantes artificielles.
M^{lle} BACHRACH, Physiologie.

Secrétaire :

M^{me} NÉTIEN, .

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

Pieux souvenirs

A MA MÈRE

Faible témoignage de gratitude et d'affection

A MONSIEUR CLAUDE FROMAGEOT

Ma profonde reconnaissance et gratitude

INTRODUCTION

La dégradation des sucres (glucides) peut se faire de façons différentes: par oxydation pure et simple, ou par un ensemble de réactions d'oxydo-réduction. Les phénomènes de fermentation appartiennent à ce deuxième groupe de réactions. Ils sont mis en œuvre par un grand nombre d'organismes parmi lesquels le ferment bulgare présente un intérêt spécial du fait de son emploi courant dans la pratique. Malgré les nombreuses études dont il a fait déjà l'objet, il reste un certain nombre de points obscurs concernant le comportement chimique de cet organisme; et il m'a paru intéressant d'éclaircir quelques-uns de ces points.

Le bacille bulgare est un producteur d'acide lactique. On connaît aujourd'hui le mode de passage d'un hexose fermentescible en acide lactique par les bactéries. La découverte d'une diastase capable de transformer le méthylglyoxal en acide lactique, la ketonaldehydmutase découverte par Dakin et

Dudley¹ et par Neuberg² a donné l'idée aux auteurs d'isoler le méthylglyoxal au cours de la fermentation lactique. C'est grâce aux recherches de Neuberg et de ses collaborateurs, que la transformation des hexoses en acide lactique par l'intermédiaire méthylglyoxal peut être considérée comme un fait acquis.

Mais, si l'on connaît le terme de passage entre un hexose fermentescible et l'acide lactique produit, on ignore à peu près complètement les relations qui peuvent exister entre les hexoses tels qu'ils se présentent naturellement, et la forme sous laquelle ils sont susceptibles d'être attaqués par les ferments.

On sait seulement que parmi les hexoses, seuls le glucose, le mannose et le lévulose sont régulièrement fermentescibles. On a rapproché ce fait de la possibilité que présentent leurs formules de donner une forme énolique commune. Quant au galactose il est susceptible dans certains cas d'être attaqué, mais l'irrégularité de cette attaque lui donne une place à part. Il m'a paru ainsi intéressant de comparer tout d'abord le comportement des quatre hexoses, glucose, levulose, mannose et galactose vis-à-vis du ferment bulgare.

Le ferment, avec lequel j'ai effectué les présentes recherches, possède toutes les propriétés du ferment de G. Bertrand³, mais contrairement à celui-ci ne

1. DAKIN et DUDLEY, *Journal of Biol. Chem.*, **14**, 155, 1913.

2. C. NEUBERG, *Bioch. Zeitsch.*, **49**, 502, 1913.

3. BERTRAND et DUCHACCK, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 402, 1909.

touche pas au galactose. Fudakwsky a annoncé que le galactose fermente aussi facilement que les autres hexoses, si l'on additionne d'autres sucres fermentescibles. Harden, Willstätter, Sohügen, etc., ont découvert que la levure de bière s'habitue au galactose. Euler et Nilson¹ constatent que non seulement la levure fraîche s'habitue à ce sucre, mais qu'aussi la levure sèche peut acquérir le même pouvoir fermentatif. Rona, Nachmansohn et Nicolai² ont trouvé que le colibacille s'habitue également au galactose. J'ai donc essayé la fermentescibilité de ce sucre en présence d'un autre sucre fermentescible, et, en faisant des passages successifs dans un milieu galactosé, j'ai voulu voir si le ferment bulgare s'habitue à ce sucre.

Le fait que les ferments lactiques contiennent de la sucrase a été signalé chez beaucoup d'espèces lactiques. Rona³ a isolé, une fois, une maltase parmi vingt différentes souches de bactéries lactiques. La lactase au contraire n'a jamais été isolée chez les bactéries lactiques. Willst. et Oppenheimer⁴ signalent que l'hydrolyse préliminaire du lactose en glucose et galactose n'est pas nécessaire, et qu'un mélange de glucose et galactose fermente plus lentement que le lactose. D'ailleurs, les monosaccha-

1. EULER et WILSON, *Z. physiol. Chem.*, 143, 106, 1925.

2. P. RONA, D. NACHMONSOHN et H.-W. NICOLAI, *Bioch. Zeitsch.*, 187, 330, 1927.

3. RONA, NACHMONSOHN et NICOLAI, même article.

4. R. WILLSTAETTER et G. OPPENHEIMER, *Zeit. f. Physiol. Chem.*, 118, 168, 1922.

rides n'ont jamais été identifiés au cours de la fermentation. Il m'a paru ainsi utile d'étudier l'action du ferment bulgare sur les disaccharides pour éclaircir quelques points de l'action des diastases, la fermentescibilité des disaccharides et pour déterminer les différentes diastases que possède le ferment bulgare.

Pour doser le lactose interverti, j'ai établi un tableau de correspondance entre les poids de lactose interverti et les poids de cuivre précipité. Cela a rendu faciles et exacts les calculs de ce dosage et a fourni un nouveau tableau de correspondance, pour le lactose interverti. Ce tableau est pareil à ceux établis par G. Bertrand pour les autres sucres.

Quelques auteurs ont signalé la transformation des pentoses en acide lactique par les bactéries. Après la découverte du méthylglyoxal comme produit intermédiaire dans la transformation du sucre en acide lactique, ces sucres ne peuvent être, théoriquement, fermentés, pour la raison que leurs molécules en C^5 ne peuvent être transformées en deux molécules de méthylglyoxal. Mais j'ai voulu vérifier cette constatation expérimentalement.

Pour déterminer si le ferment bulgare conserve ses propriétés biochimiques dans le milieu artificiel qui m'a servi à faire ces recherches, j'ai fait des passages successifs dans ce milieu additionné de sucres fermentescibles, pour voir si ce ferment, après avoir subi plusieurs passages, coagule le lait. Au cours de ces expériences, j'ai étudié la marche de la fermentation et l'activité fermentative de ce fer-

ment dans chaque passage avec un hexose: le glucose, et un disaccharide: le lactose.

La concentration du milieu en sucre joue un rôle important dans la fermentation. Aussi m'a-t-il paru intéressant de démontrer le rapport qui existe entre la concentration du milieu en sucre et l'activité du ferment bulgare, et de déterminer la dose la plus favorable à ce bacille et celle qui sert comme antiseptique pour cette bactérie.

Cardot et Richet¹ font observer qu'il y a des irrégularités dans la fermentation lactique. Lumière² n'admet pas cette irrégularité, tandis que les recherches approfondies de Mlle Bachrach³ démontrent l'existence de variations biologiques du ferment lactique, et ses conclusions concordent avec celles de Cardot et Richet.

Dans mes recherches, je n'ai pas remarqué d'irrégularité avec le ferment bulgare. D'ailleurs, les expériences que j'ai faites pour déterminer la relation entre la quantité de semence et l'activité de la fermentation, ont abouti à des résultats confirmant la régularité de la fermentation lactique par le ferment bulgare.

Ces recherches ont été faites au laboratoire de bactériologie de l'Institut de Chimie de Lyon.

Le ferment en question m'a été fourni par les la-

1. CARDOT et RICHET, *Annales de l'inst. Pasteur*, **33**, 575, 1919.
Voir aussi CARDOT, *Annales Inst. Past.*, **37**, 996, 1923.

2. LUMIÈRE, *C. R. Acad. des Sciences*, 258, 1924; *Annales Inst. Pasteur*, **38**, 344, 1924.

3. Mlle BACHRACH, *Thèses*, 1924 (Paris).

boratoires Carrion de Paris et a été soumis à des épreuves de purification au début de ce travail.

Je remercie M. Claude Fromageot ; il m'a prodigué ses précieux conseils qui m'ont servi pour expliquer ces phénomènes de fermentation. Je lui exprime ma profonde reconnaissance pour l'accueil si bienveillant qu'il m'a toujours réservé.

Je remercie aussi M. André Bréguet, ancien chef de laboratoire de bactériologie qui m'a beaucoup facilité ces travaux.

Mes remerciements vont également à M. Paul Chambard, chef actuel de ce laboratoire, qui ne m'a jamais refusé son aide pour accomplir ces recherches.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS

I

MILIEUX DE CULTURE

a) MILIEUX NATURELS

1° *Le lait seul.*

Préparation. — On fait bouillir, doucement, pendant 5 minutes, un litre de lait frais dans une capsule. On laisse complètement refroidir à l'abri de l'air. Ensuite on agite vivement le lait à l'aide d'une baguette de verre et on vérifie la réaction au papier de tournesol. Il faut que la réaction soit neutre ou à peine acide. En aucun cas, elle ne doit être alcaline. On filtre sur une passoire et on répartit par 100 cm³ dans des ballons à 200 cm³. On stérilise, entre 105° et 110°, dans l'autoclave, pendant 30 minutes, sans jamais atteindre cette température (En stérilisant le lait à 110° ou plus, surtout s'il est alcalin, on produit une caramélisation du lactose, en

même temps qu'une partie de la caséine est peptonisée.

Le ferment bulgare pousse très vite sur le lait. 14 heures à l'étuve à 45° sont suffisantes pour coaguler le lait en bloc. Mis à la température ordinaire du laboratoire, le ferment y reste actif pendant 14 à 18 jours après le séjour à l'étuve.

Pour conserver le ferment bulgare sur le lait seul, il faut par conséquent le repiquer tous les dix jours.

2° *Le lait additionné de carbonate de chaux.*

Préparation. — On fait bouillir le lait seul, comme il est indiqué ci-dessus, et on répartit dans des ballons contenant 4 grammes de CO_3Ca chacun à 200 cm³ à raison de 100 cm³ par ballon, et on stérilise entre 105 et 110° pendant 30 minutes.

Duchacck¹ constate que la stérilisation du lait et des milieux artificiels avec le carbonate de calcium est très difficile. Le lait doit être stérilisé six à huit fois à intervalles d'un ou deux jours. Pour être sûr que la stérilisation a été bien effectuée, on ne doit se servir que du lait qui, après 7 à 8 jours d'étuve à 45°, est resté stérilisé.

Ce milieu est très favorable à cause du carbonate de chaux, lequel n'agit pas seulement en supprimant l'acide lactique, déjà formé, qui a une influence défavorable sur le ferment, mais favorise encore, d'une autre manière, le développement de la cul-

1. DUCHACCK, *Annal. Inst. Pasteur*, p. 298, 1915.

ture. Les carbonates de magnésium et de zinc ne sont pas favorables à la culture, tandis que le phosphate monocalcique, même sans carbonate, favorise la culture ¹.

Alors que la culture sur le lait seul est stérile au dix-huitième jour, la culture sur le lait avec 4 % de carbonate de chaux conserve le ferment bulgare avec toute son activité pendant 4 mois.

b) MILIEUX ARTIFICIELS

Le ferment bulgare ne pousse pas sur les milieux usuels de laboratoire. Aussi, en dehors du lait, il ne se cultive pas facilement sans perdre ses propriétés biochimiques. Mais, étant donné la grande quantité de lactose qu'il renferme, le lait ne peut être admis comme milieu de culture pour les expériences de laboratoire; car celles-ci exigent un milieu artificiel ne contenant aucun sucre.

Parmi les nombreux milieux ² qui ont été essayés, le milieu artificiel de MM. G. Bertrand et F. Duchacck ³, est le plus favorable pour le développement de ce ferment.

1. *Loc. cit.*

2. *Annales Pasteur*, 23, 404, 1909.

3. *Loc. cit.*

MILIEU DE BERTRAND ET DUCHACCK.

Composition :

Touraillon.	30 grammes
Eau.	1000 cm ³
Peptone Chapoteau . . .	10 grammes
Carbonate de chaux. . .	30 —
Sucre fermentescible. . .	30 —

Préparation. — On fait une décoction de touraillon ¹ préparée en faisant bouillir, pendant un quart d'heure, 30 grammes de touraillon dans un litre d'eau ². On filtre sur papier chardin et on complète le liquide à 1.000 cm³. On dissout dans ce liquide 10 grammes de peptone chapoteau et 30 grammes de glucose ou un des sucres fermentescibles. On répartit ensuite à raison de 50 cm³ dans des ballons de 100 cm³ contenant chacun 1 gr. 5 de carbonate de chaux. On stérilise à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes.

Il arrive quelquefois que le milieu ainsi stérilisé se trouble à l'étuve et forme des voiles à la surface. Le carbonate de chaux retarde aussi, dans les milieux artificiels, une bonne stérilisation. Par conséquent, la même précaution que pour la stérilisation du lait additionné de carbonate de chaux est nécessaire pour celle des milieux artificiels additionnés de carbonate de chaux.

1. Les touraillons sont des germes d'orge desséchés.

2. D'où résulte la dissolution d'environ 12 grammes de matière minérale et organique.

Le bacille bulgare pousse très rapidement sur ce milieu. Au bout de 14 heures à 45°, le milieu est déjà trouble et la culture est abondante. Pour essayer l'activité biochimique du ferment bulgare sur ce milieu, 10 passages successifs ont été faits, de 24 heures, à l'étuve à 45°. Repiqué après chaque passage sur du lait stérile, le ferment le coagule en moins de 24 heures à l'étuve à 45°. Donc, le ferment conserve toute son activité biochimique dans le milieu Bertrand.

Le milieu Bertrand, dépourvu du sucre fermentescible, n'est pas favorable au développement du ferment bulgare, mais en présence des sucres fermentescibles, le ferment pousse bien et garde ses propriétés biochimiques. Ce milieu rend donc grand service dans la recherche de l'action du ferment bulgare sur les sucres, étant dépourvu des sucres étrangers qui compliquent le dosage du sucre.

II

PROPRIÉTÉS DU FERMENT BULGARE

Morphologie. — Il se présente, en culture jeune, dans le lait ou dans les milieux de culture artificiels favorables, sous la forme d'un gros bacille d'un aspect voisin du bacille charbonneux. Toutefois, les articles sont très courts (2 à 20 μ)¹. Il ne donne de spores dans aucun des milieux où il a été cultivé. Il se présente en chaînette de deux ou trois éléments, rarement de quatre ou cinq, quelquefois en bâtonnets isolés.

Dans quelques milieux non favorables, le ferment prend la forme d'un long filament.

Voici quelques formes du ferment :



1



2

¹ COHENDY, *C. R. Soc. Biol.*, p. 558, 1906.

(1) Ferment bulgare sur milieu Bertrand, glucosé après 48 heures à l'étuve à 45°. Le ferment est normal.

(2) Ferment bulgare sur le milieu suivant:

Petit lait. .	1000	cent. cubes
Peptone. .	10	—
CO ³ Ca. . .	30	—

Après 48 heures à 45°, le ferment, vivant mal dans ce milieu, prend la forme de filaments longs et sinueux.

Coloration. — Le bacille vivant dans la culture prend fortement la coloration au gram, mais le bacille mort dans la culture ne le prend pas.

Il arrive très fréquemment, lorsqu'on examine une culture microbienne en bouillon, qu'après les divers temps de la méthode de coloration, il ne reste plus rien, ou presque, sur la plaque. Toute observation microscopique devient impossible. Cet accident paraît tenir à la présence dans le bouillon de culture (par conséquent dans le liquide) d'étalage, sur la plaque, de sucres qui nuisent à la fixation. La méthode empruntée à la technique de Masson pour le collage des coupes microscopiques convient aussi bien pour le collage de cultures contenant des sucres après les plaques. Voici la méthode de Masson:

I. Faire gonfler à froid, puis dissoudre à chaud, 1 cm² de gélatine extra pure, en feuille, dans 20 cm³ d'eau distillée.

II. Mélanger:

Alcool à 95°.	40 cm ³
Formol	10 —

(dans un flacon compte-gouttes).

Déposer une goutte d'eau gélatineuse au centre d'une lame propre, ajouter une goutte du bouillon microbien et étaler à la pipette comme à l'ordinaire. Laisser complètement sécher.

Recouvrir largement avec l'alcool-formol et laisser agir 2 ou 3 minutes. La gélatine est tannée.

Egoutter l'excès de réactif sans sécher, fixer la préparation à l'alcool-éther, comme à l'ordinaire.

Colorer enfin, comme à l'ordinaire.

Cette méthode donne des résultats excellents avec la culture de ferment bulgare, car celui-ci ne peut être cultivé dans des milieux non sucrés.

COLORATION SPÉCIFIQUE POUR LE BACILLE BULGARE

Comme le ferment bulgare se trouve souvent mélangé à d'autres espèces, R. Ochler¹ a recours à la coloration par une solution de bleu de méthylène de Löffler, pour le reconnaître. On prépare une culture dans le lait à 45°-50°, on fixe la préparation, qu'on abandonne dix secondes dans le colorant Löffler. Les bacilles bulgares se colorent en *rouge*.

Le ferment bulgare est un aérobie facultatif marquant une légère préférence pour l'anaérobiose.

1. Microbiologie de Kayser, p. 324.

Température optima : 45°¹.

Mobilité : nulle.

Vitalité : sa vitalité n'est pas diminuée après 24 heures à 0°. Il est tué par un séjour de quelques minutes à 63°. Il est mort après une minute et demie à 100°.

Il donne une culture abondante dans le lait additionné de 6 grammes d'acide lactique par litre. Une dose plus élevée, 8 grammes, empêche son développement.

Le carbonate de chaux est indispensable pour la vitalité de ce ferment. Celui-là neutralise l'acidité produite par le microbe et prolonge ainsi la vitalité dans la culture.

Kissoff et Klin Wochsch² trouvent que le carbonate de chaux favorise aussi la vitesse de la fermentation.

La culture du ferment bulgare est impossible sans sucre fermentescible. Cultivé sur un milieu sucré, le ferment se développe bien en transformant le sucre en acide lactique. S'il y a du carbonate de chaux dans le milieu, le ferment se développe jusqu'à la disparition de tout sucre fermentescible. Mais quand le sucre a disparu, on ne trouve que des cadavres microbiens dans la culture.

1. *Loc. cit.* — Voir aussi *le Lait*, p. 816, 1922 (par E. KLEBS).

2. *Chemical abstracts*, année 1924, p. 133.

III

PRODUITS DE LA FERMENTATION PAR LE FERMENT BULGARE

Ces produits ont été étudiés par Bertrand et Weisweiller ¹, Bertrand et Duchacck ², sur le lait et les milieux artificiels.

Les produits de la transformation sont les mêmes avec toutes les espèces de sucre fermentescibles, en milieu naturel ou en milieu artificiel.

1. PRODUIT PRINCIPAL.

D'après ces auteurs, la presque totalité de sucre disparu est transformé en acide lactique. Cette acidité, au point de vue optique, est formée, dans le milieu artificiel de touraillon peptoné, d'un acide lactique inactif, alors que, dans le lait, il y a un peu moins d'acide lactique gauche que d'acide lactique droit, et le mélange acide reste destroyre.

1. BERTRAND et WEISWEILLER, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 977, 1906.

2. BERTRAND et DUCHACCK, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 402, 1909; *Bioch. Zeitsch*, **20**, 100, 1909.

Forme d'acides lactiques produits par les bactéries.

L'acide lactique formé par les bactéries est inactif, gauche ou droit. Il peut se présenter des cas où l'on a l'acide inactif à côté de l'acide actif.

Les ferments qui forment l'acide inactif dans le lait conservent cette propriété en général dans les milieux artificiels, même si le sucre est changé.

Jensen admet un enzyme spécial pour chacun des deux acides actifs ; dans des conditions favorables le microbe produit l'acide qu'il peut former le plus facilement ¹.

Nous donnons ci-dessous certaines bactéries avec la forme de l'acide qu'elles forment.

I. Acides inactifs :

Streptococcus pyogènes.

— aureuse

— citreuse.

Bacille de la Mannite contagieuse.

II. Acides gauches :

Bacille de Schardinger.

— de Tate.

— de Bischler.

— typhique d'Eberth.

1. *Le Lait*, I, p. 242, 1921.

III. Acides droits:

- Bacille dipthericus.
- Coli commun.
- Ovale ilei.
- Gracilis ilei.
- Scarlatinum.
- Mas spor. Freudenreiche.
- Guillebeau.
- de l'érysipèle.

Lewkwitch et Maly ont constaté que le *penicillium glaucum* fournit, avec l'acide inactif, de l'acide droit.

Nencki a démontré que les microbes différents donnent des acides différents. Les conditions de la culture et la richesse alimentaire du milieu jouent un certain rôle. Ainsi le même microbe ne donne pas toujours le même acide avec le même sucre.

Péré a trouvé que le *B. Coli* commun donne avec le dextrose de l'acide dextrogyre, et avec le levulose de l'acide inactif. Mais dès qu'on le place dans des conditions défavorables, on a de l'acide droit. Il consomme de l'acide gauche comme cela arrive avec beaucoup d'autres végétaux.

D'autres ferments peuvent agir ainsi ; ils peuvent, ou ne pas produire les deux acides à la fois, ou détruire l'un plus facilement que l'autre, suivant les conditions de la culture. C'est exactement le cas avec le ferment bulgare.

Le bacille de Tate donne de l'acide gauche avec dextrose et mannite, de l'acide inactif avec la rham-

nose. D'où un exemple très rare d'un ferment qui donne des acides différents au point de vue optique avec des sucres différents.

Mais Kayser¹ montre que les quinze ferments lactiques qu'il a étudiés donnent la même forme d'acide avec tous les sucres. Il y en a cependant qui peuvent donner divers acides suivant le milieu dans lequel ils sont ensemencés. Le même auteur signale aussi qu'on obtient la même forme d'acide lactique au début et à la fin d'une même fermentation.

II. PRODUITS ACCESSOIRES.

On sait qu'il y a deux groupes de ferments lactiques: 1^o les ferments lactiques vrais qui transforment les sucres intégralement en acide lactique à quelques centièmes près, sans donner lieu à des produits accessoires en notables quantités; 2^o les pseudo-ferments lactiques qui se distinguent par une production plus ou moins abondante des produits accessoires variables avec l'espèce et les conditions d'expérience.

Les produits accessoires formés par les ferments lactiques vrais sont, en général, l'acide acétique, l'acide formique et très rarement l'acide succinique; alors que le deuxième groupe donne naissance, en plus grandes proportions aux produits suivants: acide acétique, acide formique, acide propionique,

1. Edmond KAYSER, Contribution à l'étude de la fermentation lactique, p. 67-72 (*Thèse*, 1894).

acide succinique, alcool, acétone, CO_2H^2 et $(\text{CH}^4$ par le *Bacillus lactis* Escherich). Ces produits sont formés d'après Grey¹ dans la phase où beaucoup de bactéries périssent.

Bertrand, Weissweiller et Duchacck ont déterminé ces produits accessoires pour le ferment bulgare avec les différents sucres. Ces produits sont les mêmes avec toutes les espèces de sucres fermentescibles. Dans l'acidité totale on trouve 2 % environ d'acide succinique, 2 % à peu près d'acide acétique et 0,1 % d'acide formique.

Parmi les substances volatiles, on ne trouve ni l'alcool ni l'acétone.

Ainsi le ferment bulgare fournit un exemple d'un ferment lactique vrai qui donne naissance à la production d'acide succinique.

1. E.-Ch. GREY, *Proc. Roy. Soc.*, 93, 105, 1917.

CHAPITRE II

PROCÉDÉS DES EXPÉRIENCES

I

PRÉPARATION DU MILIEU EMPLOYÉ POUR LES RECHERCHES

Pour toutes les expériences avec les divers sucres, j'ai employé le milieu de Touraillon, qui est le plus favorable.

PRÉPARATION DU MILIEU POUR LES EXPÉRIENCES

On dessèche, durant 12 heures, 50 grammes de CO^3Ca pur, à l'étuve, à 110° .

Dans 20 ballons de 100, on place 1 gr. 5 très exactement (balance de précision) de CO^3Ca sec.

On prépare le liquide suivant, à chaud :

Eau de Touraillon	1000 centim. cubes
Peptone Chapoteau	10 —
Sucre	30 grammes

On complète à 1.000 après refroidissement.

Dans chaque ballon on met 50 cm³ très exactement (à la pipette exacte) du bouillon précédent.

On stérilise 20 minutes à 115°¹.

Ensemencement.

On ensemence chaque ballon avec 2 gouttes de culture jeune, âgée de 24 heures, dans le lait.

On cultive à 45°.

On agite les ballons une fois seulement, au moment de l'ensemencement.

On opère toujours de la même manière pour tous les ballons de la même expérience et pour toutes les expériences qui *se ressemblent*.

On arrête la fermentation dans chaque ballon par chauffage au bain-marie pendant 10 minutes après 14, 24, 48, 72, 96 heures, etc., jusqu'à disparition totale du sucre.

On dose le sucre qui reste, le carbonate de chaux disparu et le carbonate de chaux qui reste aussi.

On calcule ainsi l'acide lactique formé.

OPÉRATION AVEC LES EXPÉRIENCES DE PASSAGES SUCCESSIFS

On emploie toujours la même méthode pour la préparation du milieu.

1. La stérilisation doit être vérifiée toutes les fois, en mettant un ballon témoin à l'étuve à 45° pendant deux jours. Le milieu doit être stérile après ce séjour; autrement on doit stériliser de nouveau les autres ballons deux, trois ou quatre fois si c'est nécessaire. C'est le CO² surtout qui retarde la stérilisation.

On ensemeuce un ballon avec 2 gouttes d'une culture jeune (24 h.) de ferment bulgare dans du lait.

On la cultive à l'étuve à 45° pendant 24 ou 48 heures¹, au bout desquelles on en prélève 10 gouttes et on ensemeuce un deuxième ballon qu'on porte à l'étuve à 45° pendant 24 ou 48 heures. On continue ainsi les passages successifs.

Chaque ballon, après le séjour des 24 ou 48 heures à l'étuve, et après le prélèvement, est porté au bain-marie bouillant, pendant 10 minutes, pour arrêter la fermentation.

On dose ensuite le sucre restant, le CO^3Ca restant et le CO^3Ca dissous.

Le but de ces essais est de voir si le ferment bulgare garde ses propriétés biochimiques après des passages successifs dans le même milieu avec différents sucres.

1. Lorsque le sucre se transforme totalement en 24 heures à l'étuve les passages successifs deviennent impossibles si on laisse le ballon à l'étuve pendant 48 heures après lesquelles le ferment est mort. Au contraire, si le sucre après 48 heures à l'étuve n'est pas transformé totalement, le passage peut être continué.

II

MÉTHODES D'ANALYSE

On arrête la culture après le séjour voulu, en chauffant le ballon de culture dans l'eau bouillante au bain-marie pendant 10 minutes.

Pour commencer l'analyse, la culture doit être chaude, sinon on la chauffe pendant 5 minutes au bain-marie.

On filtre sur papier-filtre en agitant le ballon de culture.

On rince bien le ballon, à l'eau distillée chaude, pour vider tout le contenu, et on passe ce liquide sur le filtre. On lave aussi le précipité à l'eau chaude.

On laisse refroidir le liquide, et on complète, à l'eau distillée, jusqu'à 250 cm³ dans un ballon jaugé.

a) DOSAGE DE CO³Ca RESTANT.

On filtre le précipité qui reste dans un erlenmeyer à l'aide d'un entonnoir. On lave bien le papier-filtre, à l'eau distillée chaude, jusqu'à disparition complète de CO³Ca dissous.

On ajoute 50 cm³ HCl N/1 et on fait bouillir le mélange pendant 5 minutes pour chasser le CO².

On laisse refroidir, et on titre l'excès de l'acidité avec la soude normale en présence du rouge de méthyle comme indicateur.

b) DOSAGE DE CO^3Ca DISSOUS

Pour doser le carbonate de chaux disparu, on a deux méthodes:

1. On calcule la différence entre le carbonate de chaux qui reste dans le ballon témoin et celui qui reste dans le ballon mis à l'analyse.

2. On doit vérifier le calcul par la méthode suivante:

On prend 100 cm^3 de liquide du ballon jaugé; on ajoute 2 cm^3 de NH^4OH et 10 cm^3 de NH^4Cl à 20 %. On chauffe le mélange jusqu'à l'ébullition.

On prend 30 cm^3 d'oxalate d'ammoniaque à 5 % (un excès) dans un autre erlenmeyer et on le met à l'ébullition aussi.

On ajoute ce dernier liquide au premier à l'ébullition.

On laisse déposer l'oxalate de calcium.

On filtre, on lave le précipité à l'eau chaude jusqu'à disparition de chlorure et d'oxalate dans l'eau.

On passe le précipité dans un erlenmeyer à l'aide d'un entonnoir.

On dissout dans 20 cm^3 de SO^4H^2 concentré.

On titre la solution à 60° avec le permanganate.

c) DOSAGE DU SUCRE.

Dans une fiole jaugée à deux traits de 50 à 55 cm^3 on verse la culture jusqu'au trait 50, et on complète

le volume à 55 cm³ avec une solution de sulfate mercurique (renfermant 50 grammes de sel, 17 cm³ d'acide sulfurique à 66 B. et une quantité d'eau suffisante pour faire 130 cm³).

On mélange et on jette le tout sur un filtre. Le liquide filtré est ensuite additionné d'un excès de poudre de zinc et agité de temps en temps, jusqu'à ce qu'il ne reste plus de mercure en solution. On reconnaît facilement que le résultat est atteint, lorsqu'une goutte de liquide placée sur une lame de cuivre, fraîchement polie, n'y produit aucun dépôt grisâtre.

On filtre pour enlever le zinc et on détermine sur le liquide limpide le pouvoir réducteur d'après la méthode de Bertrand ¹.

DOSAGE DU LACTOSE INTERVERTI.

Pour doser le lactose interverti, j'ai fait un tableau pareil à celui du glucose établi par M. Gabriel Bertrand.

La méthode que j'ai suivie est celle-ci :

A l'aide d'une solution titrée de lactose à 5 %, j'ai fait deux dosages du lactose avant l'intervention et dix dosages après l'intervention.

1. G. BERTRAND, *Bull. Soc. Chim. de Paris*, 3^e série, t. 35, page 1285, 1906. Voir aussi G. BERTRAND et G. WEISWEILER, *Annales Pasteur*, p. 977, 1906.

Les deux dosages du lactose sont faits comme suit :

I	4 ^{cc} de la solution sucrée	+	16 ^{cc} d'eau distillée
II	16 ^{cc} —	+	4 ^{cc} —

Les dix dosages du sucre interverti sont faits avec : 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 et 20 cm³ de la solution sucrée en complétant chaque fois la quantité de la solution sucrée à 20 cm³ avec l'eau distillée.

Pour faire l'intervention. je verse le liquide sucré dilué à 20 cm³ avec l'eau distillée dans un erlenmeyer; j'ajoute 1 cm³ d'HCl concentré et je fais bouillir pendant une heure et quart (temps reconnu suffisant pour l'intervention).

Pour éviter l'évaporation pendant l'intervention, un petit réfrigérant convenable est employé.

Je laisse refroidir et j'ajoute 1 cm³ de soude à 36 B. pour neutraliser l'acidité, et je suis la technique de la méthode de Bertrand et Thomas pour le dosage de sucre.

Voici le tableau de la correspondance de lactose interverti en cuivre calculé en milligrammes.

Lactose en mgs		Cuivre en mgs	Lactose en mgs		Cuivre enmgs
10.		19,9	56.		102,8
12.		23,7	58.		106,1
14.		27,5	60.		109,4
16.		31,4	62.		112,6
18.		35,2	64.		115,9
20.		39,0	66.		119,1
22.		42,7	68.		122,4
24.		46,4	70.		125,6
26.		50,2	72.		128,8
28.		53,9	74.		132,0
30.		57,6	76.		135,1
32.		61,2	78.		138,3
34.		64,7	80.		141,5
36.		68,3	82.		144,5
38.		71,8	84.		147,5
40.		75,4	86.		150,6
42.		78,9	88.		153,6
44.		82,4	90.		156,6
46.		85,8	92.		159,8
48.		89,3	94.		162,9
50.		92,8	96.		166,1
52.		96,1	98.		169,2
54.		99,4	100.		172,4

CHAPITRE III

ACTION DU FERMENT BULGARE SUR LES SUCRES

J'ai étudié l'action du ferment bulgare sur les principaux sucres, que je divise en trois groupes :

I. Des sucres réducteurs non hydrolysables, parmi lesquels j'ai essayé

a) Quatre hexoses $C^6H^{12}O^6$:

- (1) Glucose
- (2) Galactose
- (3) Mannose
- (4) Levulose

b) Deux pentoses $C^5H^{10}O^5$

- (1) Arabinose
- (2) Xylose.

Les trois premiers hexoses, ainsi que les deux pentoses sont à fonction aldéhyde :



Seul le lévulose est à fonction cétonique :



II. Des sucres hydrolysables non réducteurs.

- (1) Saccharose.

III. Des sucres hydrolysables et réducteurs:

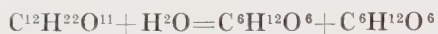
(1) Lactose.

(2) Maltose.

Ces trois sucres ont pour formule:



Ils s'hydrolysent par l'action de diastase; le saccharose en glucose et lévulose; le lactose en glucose et galactose; et le maltose en deux molécules de glucose.



I

ACTION DU FERMENT BULGARE
SUR LES HEXOSES

1° ACTION SUR LE GLUCOSE.

Le milieu de culture a été préparé par la méthode indiquée page 21.

Chaque ballon contient :

Eau de Touraillon peptonisée. . .	50 cm ³
Carbonate de chaux	1 gr. 50
Glucose	1 gr. 50

Cinq ballons de ce milieu ont étéensemencés avec deux gouttes d'une culture pure de 24 heures à 45° de ferment bulgare sur du lait.

Les ballons ont été portés à l'étuve à 45° avec un ballon témoin non ensemencé.

La fermentation dans les cinq ballons a été arrêtée après 14, 24, 48, 88 et 96 heures.

Le dosage des produits a été opéré directement après l'arrêt de la fermentation.

Voici le dosage de glucose, carbonate de chaux restant et carbonate de chaux dissous dans ces ballons :

Ballons	Age de la culture	Glucose restant dans la culture	CO ³ Ca restant dans la culture	Carbonate de chaux dissous	Acide lactique formé	Acide lactique pour %
	heures	grammes	grammes	grammes	grammes	p. %
témoin	—	1,653	1,447	—	—	—
I	14	1,479	1,422	0,025	0,075	4,5
II	24	1,425	1,385	0,062	0,104	6,3
III	48	0,211	0,757	0,690	1,22	73,0
IV	88,30	0,0857	0,665	0,782	1,48	89,8
V	96	0,038	0,665	0,782	1,48	89,8

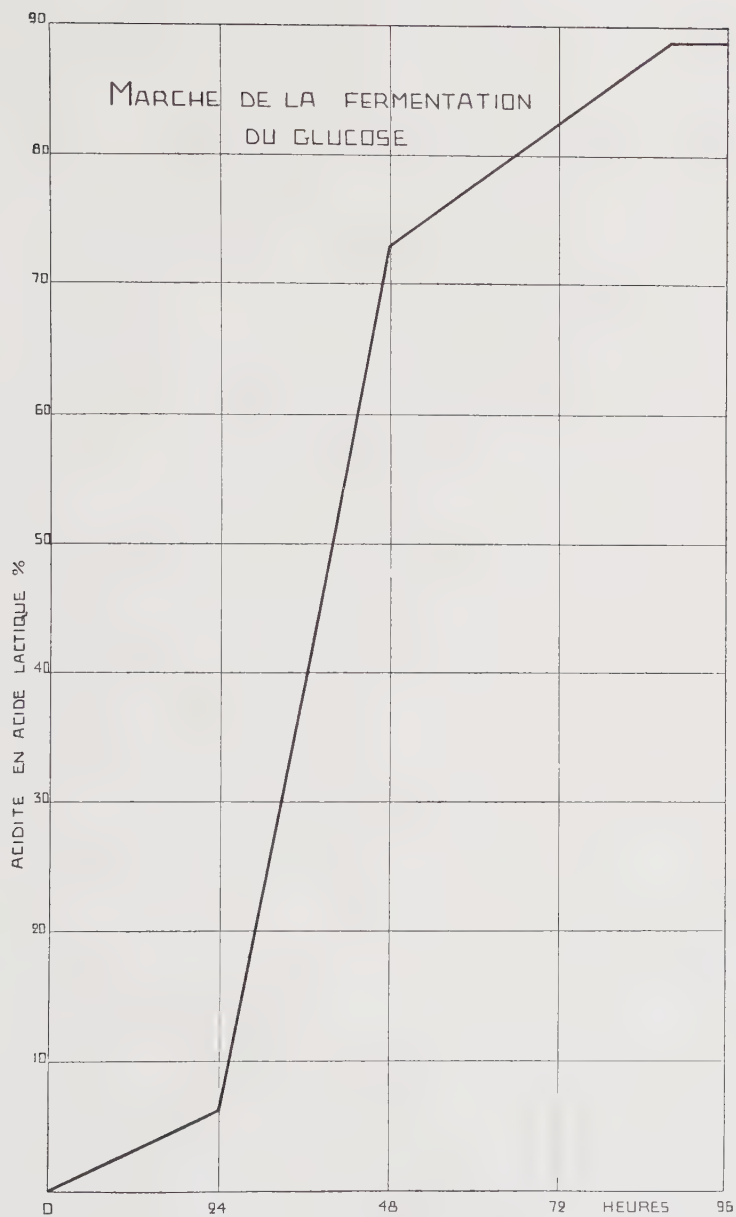


FIG. 1

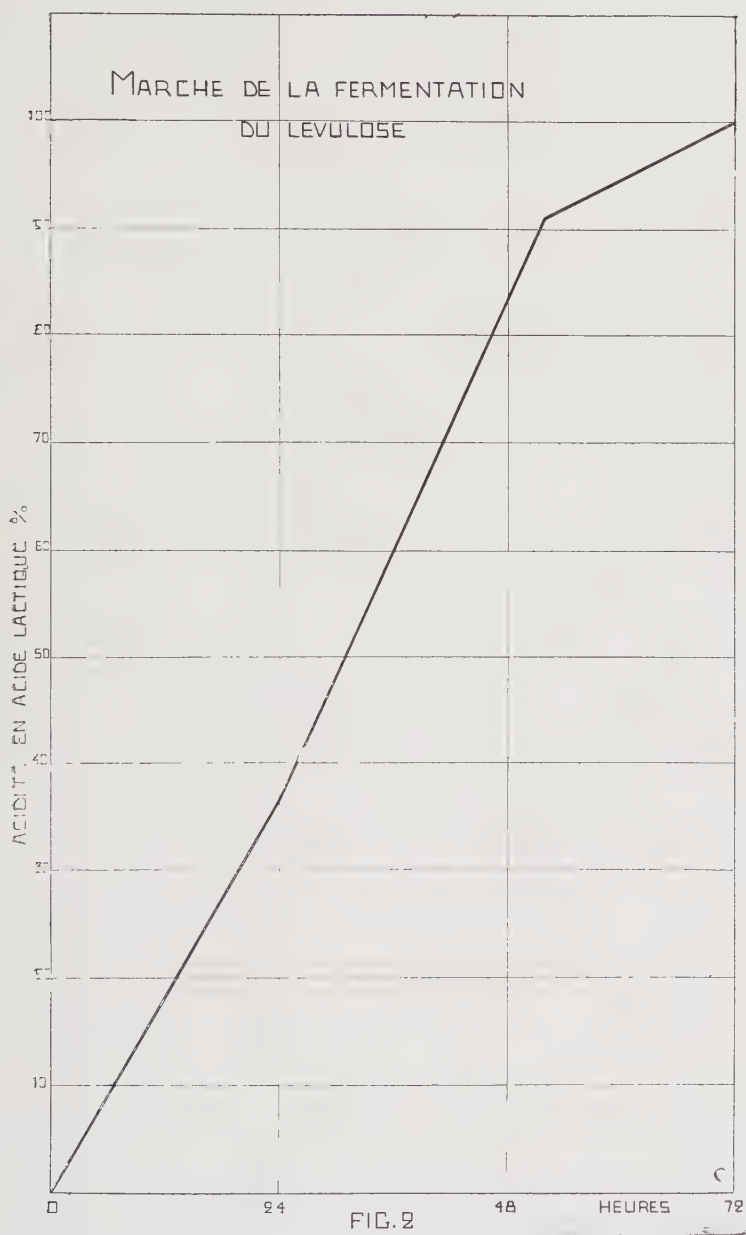
2° ACTION DU FERMENT BULGARE SUR LE LÉVULOSE

J'ai préparé des ballons contenant le milieu de culture suivant:

Eau de touraillon peptonisée. 50 cm³
 Carbonate de chaux. 1 gr. 5
 Lévulose. 1 gr. 5

J'aiensemencé chacun de ces ballons avec deux gouttes d'une culture pure de ferment bulgare sur du lait âgé de 24 heures, à l'étuve à 45°. J'ai mis les ballons à l'étuve à 45° également, et j'ai obtenu les résultats suivants:

	Age de la culture	Dosage du sucre	Dosage de CO ³ Ca restant	CO ³ Ca dissous	Acidite en acide lactique	Acide lactique pour %
	heures	grammes	grammes	grammes	grammes	p. %
témoin	—	—	—	—	—	—
I	24	1,81	1,45	—	—	—
II	52	1,1	1,16	0,29	0,54	37,2
III	72	0,266	0,50	0,95	1,7	91,1
		—	0,45	1,0	1,8	100



3° ACTION DU FERMENT BULGARE SUR LE MANNOSE

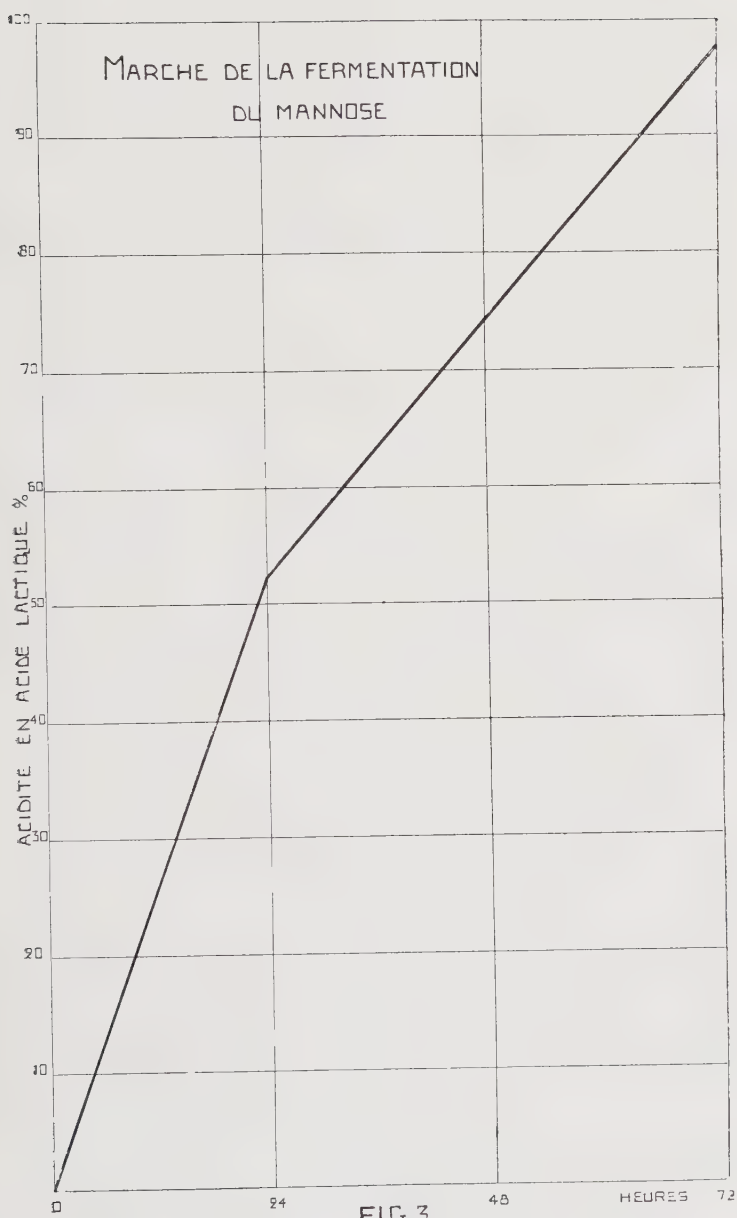
Chaque ballon contient les produits suivants:

Eau de touraillon peptonisée	50 cm ³
Carbonate de chaux	1 gr. 5
Mannose.	1 gr. 5

Cinq de ces ballons ont étéensemencés de deux gouttes d'une culture pure de ferment bulgare, de 24 heures, à 45° sur du lait.

Voici les résultats obtenus après un séjour à l'étuve à 45°:

Numéro	Age de la culture	Dosage du sucre	Dosage du CO ₂ Ca restant	CO ₂ Ca dissous	Acidité en acide lactique	Acide lactique pour %
	heures	grammes	grammes	grammes	grammes	p. %
témoin	—	—	—	—	—	—
I	24	1,44	1,47	—	—	—
II	48	0,63	1,025	0,44	0,79	52,3
III	72	0,39	0,87	0,60	1,08	75,0
		—	0,60	0,78	1,4	97,3



4^o ACTION DU FERMENT BULGARE SUR LE GALACTOSE

J'ai préparé le milieu de Touraillon en remplaçant le glucose par du galactose pur. J'ai réparti le milieu dans des ballons à 100 à raison de 50 cm³ par ballon.

Chacun de ces ballons contient:

Eau de touraillon.	50 cm ³
Peptone.	1 %
CO ³ Ca.	3 %
Galactose	3 %

J'aiensemencé cinq de ces ballons avec une culture de ferment bulgare âgée de 24 heures sur du lait.

J'ai mis les ballons à l'étuve à 45^o, et j'ai dosé les produits dans chaque ballon, après le séjour voulu à l'étuve.

Un ballon témoin a été mis avec ces ballons.

Voici les résultats:

Numéro du ballon	Age de la culture	Dosage du sucre	Dosage de CO ³ Ca restant	Dosage de CO ³ Ca dissous	Acide lactique formé
	heures	grammes	grammes	grammes	grammes
témoin	—	—	—	—	—
I	14	1,445	1,460	0,010	—
II	24	1,425	1,457	0,019	—
III	48	1,43	1,457	0,0197	—
IV	72	1,44	1,460	0,01	—
V	96	1,44	1,46	0,01	—

INFERMENTESCIBILITÉ DU GALACTOSE

Les analyses des milieux de culture contenant du galactose ne montrent aucune disparition du sucre durant les différents âges de culture. Au bout de 96 heures, il n'y avait pas la moindre fermentation. Quant au développement du ferment bulgare, celui-ci était très faible et ne coagulait pas le lait. Il est probable que ce développement est fait au dépens des matières nutritives dans le milieu autre que le sucre, car celui-ci n'est pas attaqué et ainsi le ferment perd sa propriété de coaguler le lait. A l'examen microscopique, la culture du ballon qui est resté 4 jours à l'étuve contient des microbes morts. On constate alors que le ferment bulgare ne touche pas au galactose.

Pasteur, Dubrunfact, Herzfield et Koch avaient aussi établi que le galactose est infermentescible.

Fudakwsky a reconnu que le galactose fermente aussi bien que le glucose, mais moins rapidement si on l'additionne d'autres sucres plus facilement attaquables. Mais en général ce sucre n'est pas attaqué par la plupart des microorganismes.

Euler et Nilson¹, dans une recherche sur la fermentation du galactose par la levure, ont constaté que la levure sèche ou fraîche peut, après avoir été

1. EULER et NILSON, *Zeit. f. Physiol. Chem.*, **143**, 106, 1925.

traitée par le galactose, acquérir le pouvoir fermentatif sur le galactose.

P. Rona, D. Nachmansohn et W. Nicolai¹ ont trouvé également que le colibacille s'habitue au galactose, et ils confirment les remarques d'Hardeu Willstalter et Sohugen que la levure de bière s'habitue aussi à fermenter ce sucre.

Il m'a donc paru utile de voir si le ferment bulgare peut acquérir le pouvoir fermentatif de ce sucre et si en additionnant un autre sucre fermentescible au galactose, il serait attaqué par le ferment bulgare.

Pour cela j'ai fait deux expériences:

I. Dans des ballons contenant un milieu de culture avec galactose, j'ai fait des passages successifs.

II. Dans des ballons contenant un milieu de culture, avec une partie de galactose et une partie égale de glucose (sucre fermentescible), j'ai essayé la fermentescibilité de ce sucre.

D'après les résultats suivants indiqués pages 41 et 42, j'ai constaté que le galactose ne s'habitue pas à la fermentation par le ferment bulgare en présence d'un autre sucre fermentescible. Et le ferment bulgare traité auparavant par le galactose n'acquiert pas le pouvoir fermentatif de ce sucre. Donc le galactose est un sucre tout à fait fermentescible par le ferment bulgare.

1. P. RONA, D. NACHMANSOHN et H.-W. NICOLAI, *Bioch. Zeitsch.*, 187, 330, 1927.

PASSAGES SUCCESSIFS

MILIEU GALACTOSÉ.

Chaque ballon contient:

Eau de touraillon peptonisée	50 cm ³
Carbonate de chaux	1 gr.5
Galactose	1 gr.5

J'ai procédé de la même manière que pour les passages successifs du glucose.

Et j'ai obtenu les résultats suivants:

Numéro de passage	Age de la culture	Dosage du galactose	Dosage du CO ² Ca restant	CO ² Ca dissous	Acide lactique formé
	heures	grammes	grammes	grammes	grammes
témoin	48	1,445	1,46	—	—
I	24	1,425	1,457	—	—
II	24	1,445	1,46	—	—
III	24	1,440	1,46	—	—

II. ACTION DU FERMENT BULGARE SUR UN MÉLANGE DE GLUCOSE ET DE GALACTOSE

J'ai réparti dans des ballons, comme d'ordinaire, le milieu de culture suivant :

Eau de touraillon peptonisée .	50 centim.cubes
Carbonate de chaux.	1 gr. 50
Glucose	0 gr. 75
Galactose	0 gr. 75

J'aiensemencé ces ballons avec deux gouttes d'une culture pure, de 24 heures à l'étuve à 45°, sur du lait.

J'ai dosé les sucres disparus et le carbonate de chaux dissous à différents âges de la culture.

Les résultats suivants montrent que seule la quantité de glucose a disparu :

Numéro de Ballons	Age de la culture	Doage du sucre	Dosage du carbonate de chaux	Carbonate de chaux dissous	Acide lactique pour %
	heures	grammes	grammes	grammes	grammes
témoin	—	—	—	—	—
I	48	1,48	1,47	0,44	53,3
II	96	0,65	1,03	0,44	53,3

FERMENTATION DES HEXOSES

D'après les expériences précédentes sur l'action du ferment bulgare sur les hexoses, on constate que le glucose, le lévulose et le mannose sont fermentescibles à l'égard du ferment bulgare. Mais le galactose résiste complètement à cette fermentation.

La marche de la fermentation avec les trois hexoses fermentescibles n'est pas pareille. La vitesse de l'attaque du ferment bulgare varie aussi avec ces trois sucres.

On remarque d'abord que le glucose a presque disparu en quatre jours, le lévulose en moins de trois jours, et le mannose en trois jours.

On observe aussi que la marche de la fermentation est la suivante:

a) Avec le glucose:

I. Très lente au premier jour;

II. Très rapide au deuxième jour.

III. Lente aux troisième et quatrième jours.

b) Avec le mannose:

I. Très rapide au premier jour.

II. Moins rapide aux deuxième et troisième jours.

c) Avec le lévulose:

La fermentation marche régulièrement (la courbe de la marche de fermentation jusqu'au deuxième jour montre une régularité complète de la fermenta-

tation. Mais à ce moment la plupart du sucre a disparu et l'acidité atteint 90 %. La fermentation doit donc être terminée quelques heures avant le troisième jour. A cause de cela, la courbe peut être considérée comme uniforme aussi, jusqu'à la fin de la fermentation, et la vitesse est identique dans tous les âges de la culture).

Grinum¹ constate quatre phases dans le développement du « *Bacterium lactis acid* ».

1. Manifestation d'une forte multiplication microbienne avec une faible production d'acide lactique. Elle dure 4 à 5 heures si la température est favorable.

2. La deuxième phase se prolonge jusqu'à la douzième heure; le microbe manifeste une activité de plus en plus grande.

3. Cette activité augmente progressivement à partir de la quinzième heure jusqu'à la trentième.

4. Dans la quatrième phase, le pouvoir acidifiant diminue notablement.

Mais si on accorde ces quatre phases avec la fermentation du glucose par le ferment bulgare, les autres sucres montrent des marches de fermentation tout à fait différentes.

Pour expliquer l'infermentescibilité du galactose, la vitesse de la fermentation et la marche de la fermentation pour chacun des trois hexoses fermentescibles, nous allons montrer comment les hexoses sont dégradés au cours de la fermentation et la for-

1. *Le Lait*, p. 188, 1921.

me sous laquelle ils sont susceptibles d'être attaqués par des microbes.

MÉCANISME DE LA FERMENTATION LACTIQUE

La fermentation lactique est la plus anciennement connue, et pourtant le mécanisme de cette fermentation est toujours en question. Cette fermentation réside, on le sait, dans la dislocation de la molécule de sucre en deux molécules d'acide lactique, qu'on peut indiquer facilement par la formule :



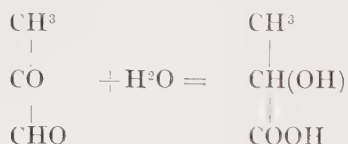
Mais, pour que la molécule de sucre se transforme en deux molécules d'acide lactique, il ne suffit pas que la chaîne en C^6 se rompe ; il faut qu'il ait y migration de groupement (OH). La formule ci-dessus n'indique que le terme final de la fermentation. Il peut y avoir des corps intermédiaires. Cela a conduit Baeyer ¹ à rechercher des analogies chimiques pour expliquer les phénomènes de la fermentation, et à construire un schéma pour la fermentation, lactique, en expliquant cet intermédiaire par des corps hypothétiques. Mais ce schéma, qui date d'un stade précoce de l'étude, qui ignorait tant de degrés

1. Ad. BAEYER, *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.*, p. 3, 63, 1870.

intermédiaires de la décomposition du sucre, peut être rejeté maintenant pour faire place aux résultats certains sur la nature de cet intermédiaire.

Nef¹ a été le premier à penser que le méthylglyoxal est l'intermédiaire par lequel l'acide lactique est formé dans ces conditions. Cet auteur² a fait une restriction en ce qui concerne la possibilité de la production d'acide lactique optiquement actif à partir du méthylglyoxal dont la molécule ne contient pas de carbone asymétrique. Mais Neuberg et Hirsch³ ont obtenu l'alcool cétonique optiquement actif par l'action de la levure sur l'aldéhyde benzoïque, montrant ainsi la possibilité de la formation de substances actives aux dépens de corps optiquement inactifs, ce qui aide l'hypothèse de Nef.

Cette hypothèse est appuyée d'ailleurs sur le fait que le méthylglyoxal donne facilement naissance à la production d'acide lactique. Il suffit de chauffer l'aldéhyde pyruvique en solution aqueuse à 100°, pour la transformer en acide lactique, réaction qui se produit même à froid en présence de potasse⁴.



1. J.-U. NEF, *Liebigs annalen*, **335**, 191, 1904.
2. J.-U. NEF, *Liebigs annalen*, **357**, 214, 1907.
3. C. NEUBERG et J. HIRSCH, *Bioch. Zeitsch.*, **115**, 282, 1921.
4. Mlle W. DENIS, *Journ. Am. Chem. Soc.*, **38**, 561, 1907.

Dakin et Dudley¹ ont découvert une diastase capable de transformer le méthylglyoxal en acide lactique et lui ont donné le nom « glyoxalase ». C'est une diastase particulière qu'on rencontre dans nombre de tissus animaux. Cette diastase a été découverte aussi, en même temps, par Neuberg² qui l'a nommée Ketonaldéhydmutase. D'après Neuberg la glyoxalase est un terme impropre, car il trouve que cette diastase se rapproche beaucoup de l'aldéhydmutase et il préfère le nom « ketonaldéhydmutase », tandis que Dakin³ montre que la glyoxalase et l'aldéhydmutase sont différents et il tient à l'appeler « glyoxalase ».

Neuberg et Gorr⁴ ont signalé que le « Bacille Coli » contient cette diastase. Ce fait montre que la transformation du méthylglyoxal en acide lactique par voie biochimique peut être considérée comme un fait acquis. Ces auteurs ont montré que ce bacille transforme quantitativement le méthylglyoxal en acide lactique.

Mais le B. Coli n'est pas considéré comme un ferment lactique vrai. Or, Neuberg et Gorr⁵ ont essayé la transformation du méthylglyoxal en acide lactique par le lactobacille, ferment lactique véritable. Ils ont constaté que cette transformation

1. H.-D. DAKIN et H.-W. DUDLEY, *Journ. of. Biol. Chem.*, 14, 155, 1913.

2. C. NEUBERG, *Bioch. Zeitsch.*, 49, 502, 1913.

3. H.-D. DAKIN, *Bioch. Zeitsch.*, 59, 193, 1914.

4. NEUBERG et GORR, *Bioch. Zeitsch.*, 162, 490, 1925.

5. NEUBERG et GORR, *Bioch. Zeitsch.*, 166, 182, 1925.

est plus rapide avec un rendement de 100 % d'acide lactique. Cela montre que les ferments lactiques vrais contiennent la ketonaldéhydmutase et que la transformation du sucre en acide lactique par ces ferments passe probablement par l'intermédiaire du méthylglyoxal. Les produits accessoires, qui prennent naissance au cours de la fermentation lactique, tels que, l'acide acétique, l'acide formique et l'alcool sont des produits faciles à obtenir à partir du méthylglyoxal. Or, Grey¹ signale que dans les fermentations du glucose, l'acide lactique se forme au moment où il y a développement intense des bactéries, alors que, dans la phase où il y a des bactéries mortes dans la culture, où la fermentation est plus faible, les réactions successives qui conduisent à la production de l'acide lactique ne se font pas avec la même aisance que lorsque la fermentation se déroule normalement. C'est dans cette phase que les produits accessoires tels que l'acide acétique, l'acide formique, l'acide succinique et l'alcool prennent naissance. Donc, dans le cas où la fermentation est faible, si ce n'est pas le corps intermédiaire lui-même qui apparaît, ce sont les produits de sa dislocation immédiate qui s'accumulent dans le milieu. Comme tous ces produits sont faciles à obtenir de la dislocation immédiate du méthylglyoxal, on peut admettre, théoriquement, que le méthylglyoxal est l'intermédiaire dans la fermentation lactique.

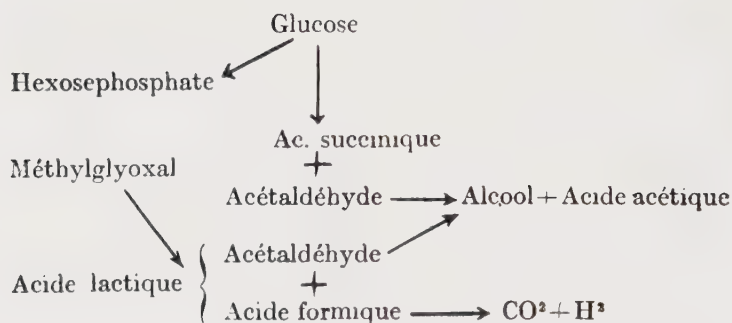
1. E.-Ch. GREY, *Proc. Roy. Soc. B.*, 90, 105, 1917.

Aubel ¹ signale que certains microbes sont capables de transformer le glucose en acide pyruvique qui disparaît peu à peu pour faire place à l'acide lactique. Mais, cette hypothèse est rejetée ensuite par le même auteur qui préfère admettre l'aldéhyde glycérique comme terme de passage entre le sucre et l'acide lactique, tandis que ce rôle de passage est rempli par le méthylglyoxal dans la production d'acide pyruvique.

Neuberg et Gorr ², d'après leurs expériences sur la fermentation du glucose par *Lactobacille*, *B. Coli* et *B. Propionicus*, ont constaté que la transformation du sucre en acide lactique par ces trois organismes passe par l'intermédiaire méthylglyoxal.

Virtanen et Sinola ³ ont constaté également que le bacille *Coli* contient un enzyme complexe, « le cozymase », qui produit l'acide lactique par cet intermédiaire et que la formation d'acide lactique par le « coli bacille » est faite de la même manière que dans la fermentation lactique vraie. Ces auteurs signalent que la formation d'acides fixes et d'autres produits accessoires à côté de l'acide lactique, représente un cas où le cozymase ne fonctionne pas. Virtanen ⁴ suppose que l'action de la fermentation par le colibacille sur le glucose est la suivante :

1. E. AUBEL, *C. R. Acad. des Sciences*, **176**, 332, 1923.
2. NEUBERG et GORR, *Bioch. Zeitsch*, **173**, 476, 1927.
3. I. A. I. VERTANEN et P.-E. SINOLA, *Zeit., Phys. Chem.*, **163**, 284, 1927 ; voir aussi *Chem. Abst.*, p. 2008, 1927.
1. 4. A.-I. VERTANEN et P.-E. SINOLA, *Zeit. f. Physiol. Chem.*, **163**, 284, 1927.



Il est intéressant de noter ici que les plantes supérieures, même en présence d'antiseptique, transforment facilement le méthylglyoxal¹. La transformation en acide lactique par les plantes est faite aussi par cet intermédiaire².

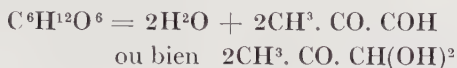
Pour mettre fin à cette discussion d'intermédiaire dans la fermentation lactique, Neuberg et Kobel³, après avoir trouvé le méthylglyoxal comme corps intermédiaire dans la fermentation lactique par différentes bactéries, ont essayé d'isoler cet intermédiaire. Ils ont choisi le *Bacille Delbrücki* pour cette recherche, car la fermentation se passe nettement et s'effectue dans un milieu neutre comme dans un milieu acide par cette bactérie. Ils ont

1. NEUBERG et GORR, *Bioch. Zeitsch.*, **166**, 482, 1925.

2. NEUBERG et GORR, *Bioch. Zeitsch.*, **171**, 475, 1926 et **173**, 358, 1926.

3. NEUBERG et KOBEL, *Bioch. Zeitsch.*, **207**, 232, 1929.

obtenu des résultats affirmatifs: presque 100 % du sucre a été transformé en méthylglyoxal:



D'après ces expériences, il n'est plus douteux qu'une molécule de sucre est décomposée en deux molécules de méthylglyoxal. Donc, dans la fermentation lactique, la chaîne de carbone se rompt avec la formation de deux molécules de méthylglyoxal. Après la formation de cet intermédiaire, il n'y a plus de rupture dans la chaîne de carbone; il y a seulement simple échange intramoléculaire et le méthylglyoxal est stabilisé en acide lactique.

Neuberg et Kobel¹ signalent également qu'ils n'ont pas trouvé d'intermédiaire entre le sucre et le méthylglyoxal.

Cl. Fromageot² a isolé le méthylglyoxal au cours de la transformation du sucre par le bacille Coli. Cet auteur montre que le méthylglyoxal est formé avec un très haut rendement, 90 %. Le chemin de transformation du sucre en acide lactique par le Colibacille est clair après ces expériences qui démontrent:

- 1) Que la formule de Harden³ est fausse;
- 2) Que l'acide lactique ne doit nullement être produit par la réduction de l'acide pyruvique comme

1. NEUBERG et KOBEL, *Bioch. Zeitsch.*, 207, 232, 1929.

2. Claude FROMAGEOT, *Bioch. Zeitsch.*, 216, 467, 1929.

3. HARDEN, *Journ. of Chem. Soc.*, 79, 610, 1901.

le signalent Aubel¹, Kostychev et Soldalenkov², etc.

3) Que la formule de Virtanen³ de la fermentation du glucose par le colibacille est fausse aussi.

DÉGRADATION DES SUCRES

La découverte du méthylglyoxal comme intermédiaire dans la transformation des glucides en acide lactique par les ferments, éclaire le chemin de dégradation des sucres.

L'hexose fermentescible élimine deux molécules d'H²O en formant un aldol. La chaîne de carbone se rompt au milieu de la molécule en formant deux molécules de méthylglyoxal ensuite. Après la formation de ce dernier il n'y a plus de rupture dans la chaîne de carbone. Par simple échange intramoléculaire, le méthylglyoxal est stabilisé en acide lactique. Cette transformation est directe, c'est-à-dire sans se servir d'aucun autre intermédiaire d'après l'équation :



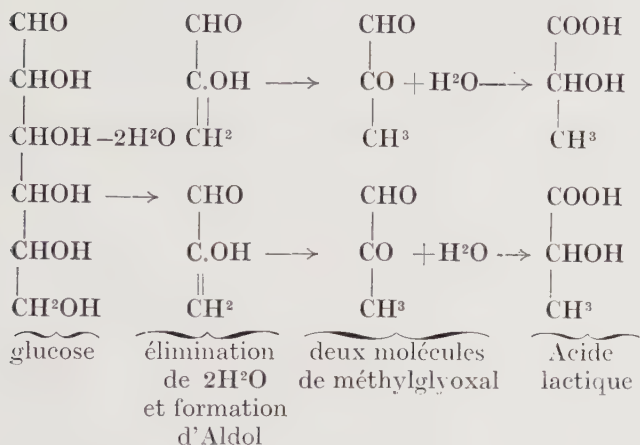
La dégradation des sucres en formant l'acide lactique peut donc être représentée par les formules successives suivantes, qui montrent les différentes étapes que subit l'hexose :

1. AUBEL, *C. R. Acad. des Sciences*, **176**, 332, 1923.

2. KOSTYCHEV et SOLDALENKOV, *Zvit. f. Physiol. Chem.*, **168**, 124, 1927.

3. Voir page 50.

DÉGRADATION DES SUCRES



D'après ces travaux, le méthylglyoxal est l'intermédiaire dans la transformation des hexoses par les ferments lactiques. Le terme de passage des sucres est devenu ainsi clair. Mais pour expliquer l'infermentescibilité de certains hexoses, ainsi que les différentes vitesses avec lesquelles le même ferment peut agir sur les différents sucres, il faut rechercher sous quelle forme les hexoses sont susceptibles d'être attaqués par les microbes.

Harden et Young ont montré que les phosphores jouent un rôle important dans la dégradation des sucres. D'après ces auteurs, le phosphore se combine sous une forme déterminée avec l'hexose fermentes-

1. A. HARDEN et W.-J. YOUNG, *Proc. Roy. Soc.*, B 77, 405, 1906; *Ibidem*, 78, 369, 1906; *Ibidem*, 80, 229, 1908; *Ibidem*, 81, 336, 1909; *Ibidem*, 82, 321, 1910.

cible et rend ce dernier attaquable, de sorte que la présence du phosphore deviendrait une condition de départ de toute fermentation. Ils ont observé également que la vitesse de la fermentation augmente, si on ajoute un phosphore alcalin à une solution sucrée mise en fermentation par la diastase alcoolique. Ce fait avait été déjà observé par Wroblewski et par Buchner ¹, dans une recherche sur le mode d'action de la zymase. Mais Buchner a attribué l'augmentation de la vitesse de la fermentation à une modification d'action du phosphate alcalin dont il s'est servi.

Mais après avoir suivi une technique précise, Harden et Young sont arrivés au résultat suivant: si l'on mesure la vitesse de la fermentation, à des intervalles très rapprochés, et si l'on prend la précaution d'employer un mélange approprié de mono et diphosphates, on constate toujours que l'augmentation de la vitesse de la fermentation est en relation étroite avec la quantité de phosphate ajoutée. Il n'est donc pas douteux que ces sels influent activement sur la marche de la fermentation.

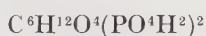
Leonid Iwanoff ² a observé que, si l'on détermine la quantité de phosphate à divers stades de la fermentation, on constate que les taux de ce sel sous sa forme minérale diminue au fur et à mesure que la fermentation progresse, pour disparaître entière-

1. Ed. BUCHNER, in *Zymasegarung*, p. 141.

2. Leonid IWANOFF, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 50, 281, 1906-1907.

ment, à un moment donné. C'est que le phosphate minérale subit une transformation profonde; il donne naissance à la production d'une combinaison organique complexe, d'où il ne peut plus être séparé à l'aide des réactifs habituels des phosphates. Donc le phosphore se combine avec les sucres pour former une nouvelle matière facile à l'attaque des ferments.

Harden et Young ¹ ont isolé et caractérisé cette nouvelle combinaison et l'ont reconnue comme un éther phosphoré constitué par deux radicaux phosphatés et un radical glucidique. Cet éther est un acide hexosediphosphorique ayant la formule suivante:



Neuberg, Farber, Levite et Schwenk ² signalent également que le produit principal, qui prend naissance dans la fermentation en présence de phosphate, est représenté par l'acide Hexosediphosphorique comme l'ont bien indiqué Harden et Young.

Il faut donc considérer cette nouvelle forme, l'hexosediphosphorique, comme point de départ dans la dégradation des sucres par les ferments en général.

1. YOUNG, *Proc. Roy. Soc.*, **81**, 528, 1909.

2. C. NEUBERG, E. FARBER, A. LEVITE et E. SCHWENK, *Bioch. Zeitsch.*, **83**, 244, 1917.

FERMENTESCIBILITÉ DES HEXOSES

D'après les résultats que j'ai obtenus concernant la fermentescibilité des hexoses, j'ai constaté que, parmi les quatre sucres: glucose, lévulose, mannose et galactose, seul le galactose est infermentescible. Ces glucides, ayant le même poids moléculaire et la même formule, montrent une différence énorme dans la fermentation par le même ferment. On peut ainsi attribuer la résistance du galactose à la fermentation au fait que celui-ci ne peut être combiné avec le phosphore pour former le même acide hexosediphosphorique qui rend le sucre fermentescible, d'après Harden et Young.

En effet, le glucose, le fructose et le mannose donnent naissance à un éther phosphoré identique. Il semble que cette combinaison se produise aux dépens d'une forme énolique, commune à ces trois hexoses. Or, si on soumet l'éther hexosephosphorique à l'hydrolyse, on obtient du fructose, quel que soit l'hexose combiné.

Schoen¹ rapproche cette réaction de celle qui donne naissance à la production de l'osazone, lorsqu'on traite ces hexoses par la phénylhydrazine et on obtient la même osazone.

Donc l'hexose qui subit la combinaison avec l'acide phosphorique éprouve une modification

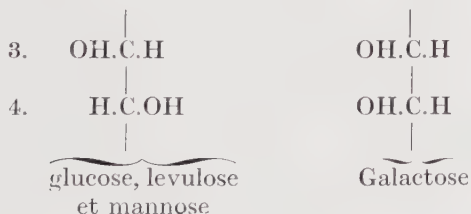
1. M. SCHÖEN, *Le problème des fermentations*, p. 124, 1926.

considérable dans sa constitution. L'éther hexosediphosphorique peut être considéré comme forme unique sous laquelle l'hexose, quelle que soit sa nature, se présente pour être attaqué par les ferments. Donc, si, au cours de la fermentation, le galactose pouvait former le même éther hexose diphosphorique, sa transformation en acide lactique serait aussi facile que pour les autres sucres. Dans les configurations moléculaires suivantes, on peut voir, en effet, la cause de cette différence entre le galactose et les autres hexoses :

1	$ \begin{array}{c} \text{C HO} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Glucose
2	$ \begin{array}{c} \text{C HO} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Glucose
3	$ \begin{array}{c} \text{C HO} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Glucose
4	$ \begin{array}{c} \text{C HO} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Glucose
5	$ \begin{array}{c} \text{C HO} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Glucose
6	$ \begin{array}{c} \text{C HO} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Glucose
	$ \begin{array}{c} \text{C HO} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Galactose
	$ \begin{array}{c} \text{C H(OH)} \\ \\ \text{C.OH} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Forme énolique
	$ \begin{array}{c} \text{C H}^2\text{OH} \\ \\ \text{C O} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{C H}^2\text{OH} \end{array} $	Lévulose
	$ \begin{array}{c} \text{C HO} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{OH.C.H} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{H.C.OH} \\ \\ \text{CH}^2\text{OH} \end{array} $	Mannose

Or, si l'on examine ces formules, on constate, comme l'a déjà observé Schoen, que le glucose et le mannose réagissent avec l'acide phosphorique par leur groupement aldéhydique d'abord, et par le groupement alcool secondaire immédiatement voisin (groupement 1 et 2 dans la figure). Le lévulose réagit avec son groupement cétonique et son groupement primaire (groupement 1 et 2 aussi), c'est-à-dire que la combinaison avec l'acide phosphorique est faite dans les groupements 1 et 2 dans la molécule de sucre pour les trois hexoses fermentescibles. On voit ainsi nettement que lorsque ces deux groupements sont combinés avec l'acide phosphorique, le reste de la molécule se trouve partout identique.

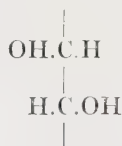
Mais si l'on compare le reste de la molécule de ces trois hexoses fermentescibles, qui est identique, entre eux, avec le reste de la molécule de galactose, on constate une différence dans l'arrangement des groupements 3 et 4.



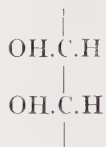
A part ces deux groupements, l'arrangement des groupements (OH) se trouve semblable dans toutes les formules d'hexoses. C'est donc dans ces groupements 3 et 4 qu'on découvre pourquoi le galactose ne forme pas un éther hexosediphosphorique identique à celui que peuvent fournir les autres hexoses

et ensuite la raison pour laquelle le galactose n'est pas attaqué par les ferments.

En effet, nous avons montré que la chaîne de carbone, dans la molécule de sucre, se rompt en donnant naissance à deux molécules de méthylglyoxal, au cours de la dégradation des sucres par les ferments lactiques, après laquelle il n'y a plus de rupture dans ces deux molécules du corps intermédiaire. Cette rupture se fait aussi au milieu de la molécule de sucre, entre les groupements 3 et 4. Mais c'est dans l'arrangement des groupements (OH) de 3 et 4 que nous avons observé la différence qui existe entre les trois formules des molécules de glucose, mannose et fructose, et celle de galactose. Nous constatons que la forme suivante que prennent ces deux groupements



est facile à la rupture par les ferments, et rend le sucre fermentescible. Alors que la forme suivante de ces groupements :



résiste à cette rupture et, très stable, ne permet pas l'attaque des micro-organismes.

MARCHE DE LA FERMENTATION AVEC LES HEXOSES FERMENTESCIBLES

Nous avons constaté que les trois hexoses fermentescibles ne fermentent pas avec la même vitesse par le ferment bulgare. Le lévulose fermente plus vite que le mannose, et celui-ci fermente plus rapidement que le glucose. Le glucose passe donc pour l'hexose le plus rebelle à l'attaque de ce ferment; alors que le lévulose est presque fermenté en deux jours, le glucose dure jusqu'au quatrième jour.

Les courbes de la marche de fermentation de ces trois sucres montrent également des différences très nettes dans la manière dont se comportent ces sucres dans la fermentation par le bacille bulgare. Ainsi la marche de la fermentation est normale avec le lévulose, la courbe du glucose montre un temps d'induction au premier jour après lequel la fermentation s'effectue très rapidement le deuxième jour, tandis qu'aux troisième et quatrième jours elle est plus lente. Mais la courbe de mannose montre un commencement très rapide suivi par une fermentation lente.

Nous avons montré que l'hexose qui se combine avec l'acide phosphorique éprouve une modification énorme dans sa constitution. Cette modifica-

tion doit avoir une influence sur la façon de se comporter au cours de la fermentation.

Lebedeff ¹ a signalé que la fermentation ne commence avec sa vitesse habituelle qu'après un certain temps d'attente (Phase d'induction). Ce phénomène est expliqué par le délai que met le sucre à subir sa transformation en hexose diphosphorique.

D'après Meyerhof ², cette phase d'induction peut être abrégée considérablement et même supprimée totalement à l'aide de quelques artifices, et tout particulièrement par l'addition, au milieu, de l'hexose-phosphate tout préparé.

Euler et Ohlsen ³ signalent que les sucres ne se prêtent à la synthèse de la transformation en hexosediphosphorique qu'après avoir subi un commencement de fermentation provoqué par un contact, même de courte durée, avec une levure vivante. Cette fermentation préalable ne serait indispensable que pour le glucose et le mannose, tandis que le fructose donnerait directement naissance à la production de l'éther hexosediphosphorique ⁴.

La courbe de lévulose, étant uniforme, explique que la fermentation est normale. La quantité du sucre fermenté durant l'unité de temps est semblable

1. A. LEBEDEFF, *Annales de l'Institut Pasteur*, **56**, 20, 1912.

2. O. MEYERHOF, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **102**, 185, 1918.

3. H.-V. EULER et H. OHLSEN, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **76**, 468, 1912; *Bioch. Zeitsch.*, **37**, 313, 1911.

4. H.-V. EULER, H. OHLSEN et D. JOHANSSON, *Bioch. Zeitschr.*, **84**, 402, 1917.

du commencement à la fin de la fermentation. Le lévulose n'éprouve aucun changement quand il se combine avec l'acide phosphorique, car nous avons vu que l'hexosediphosphorique mis à l'hydrolyse donne du lévulose, quel que soit l'hexose combiné. Cela explique également pourquoi les courbes de glucose et mannose montrent des changements dans la marche de fermentation. Ces deux sucres, une fois combinés avec l'acide phosphorique, se transforment en lévulose. Mais tandis que cette transformation est facile avec le mannose, le glucose résiste et montre un temps d'induction. On constate alors que la phosphatase est plus active avec le mannose qu'avec le glucose.

II

ACTION DU FERMENT BULGARE SUR LES PENTOSES

1. ACTION SUR LE XYLOSE.

Avec le xylose j'ai procédé, comme avec l'arabinose, dans des tubes à essai stérilisés.

Chaque tube contient :

Eau de touraillon peptonisée.	10 cm ³
Carbonate de chaux.	1 gr. 0
Xylose	0 gr. 3

Cinq de ces ballons ont étéensemencés avec une goutte d'une culture de ferment bulgare, sur du lait, âgée de 24 heures à l'étuve à 45°.

Ces ballonsensemencés ont été mis, à l'étuve à 45°, avec un ballon témoin.

Les résultats suivants ont été obtenus à l'analyse après le séjour à l'étuve :

Tubes .	Age de la culture	Dosage de xylose	Dosage du carbonate de chaux restant	Carbonate de chaux dissous	Acide lactique formé
	jours	grammes	grammes	grammes	grammes
témoin	—	—	—	—	—
I	2	0,3	0,975	—	—
II	4	0,3	0,98	—	—
III	6	0,3	0,975	—	—

2. ACTION DU FERMENT BULGARE SUR L'ARABINOSE.

Pour l'arabinose j'ai remplacé les ballons par des tubes à essai, afin de diminuer la quantité du milieu de culture, par conséquent la quantité d'arabinose employé.

Chaque tube à essai stérilisé contient :

Eau de touraillon peptonisée	10 gr. 0
Carbonate de chaux	1 gr. 0
Arabinose	0 gr. 3

Cinq de ces tubes ont étéensemencés avec une goutte chacun, d'une culture pure, de ferment bulgare sur du lait, âgée de 24 heures à 45°.

Ces tubes, avec un tube témoin nonensemencé, ont été mis à l'étuve à 45°.

A l'analyse des tubes de différents âges, j'ai obtenu les résultats suivants :

Tubes	Age de la culture	Dosage du sucre	Dosage de CO_2Ca restant	Dosage de CO_2Ca dissous	Acide lactique formé
	jours	grammes	grammes	grammes	grammes
témoin	2	0,3	0,975	—	—
I	2	0,3	0,975	—	—
II	4	0,3	0,97	—	—
III	6	0,3	0,975	—	—

D'après Kayser¹, le xylose et l'arabinose sont fermentés par différents ferments lactiques.

D'après les précédents résultats, ni l'un ni l'autre n'est attaqué par le ferment bulgare.

On sait que ces sucres possèdent la formule suivante :



Nous avons vu que le mécanisme de cette fermentation est une diastase qui attaque les sucres avec la formation de deux molécules de méthylglyoxal. Ces sucres en C⁵ ne peuvent donner deux molécules de cet intermédiaire, deux molécules en C³. Donc la fermentescibilité de ces sucres par ce mécanisme est impossible comme ces résultats l'ont prouvé.

1. KAYSER, Contribution à l'étude de la fermentation lactique, *Thèse* 1894, p. 13.

III

ACTION DU FERMENT BULGARE SUR LES DISACCHARIDES

1^o ACTION SUR LE LACTOSE.

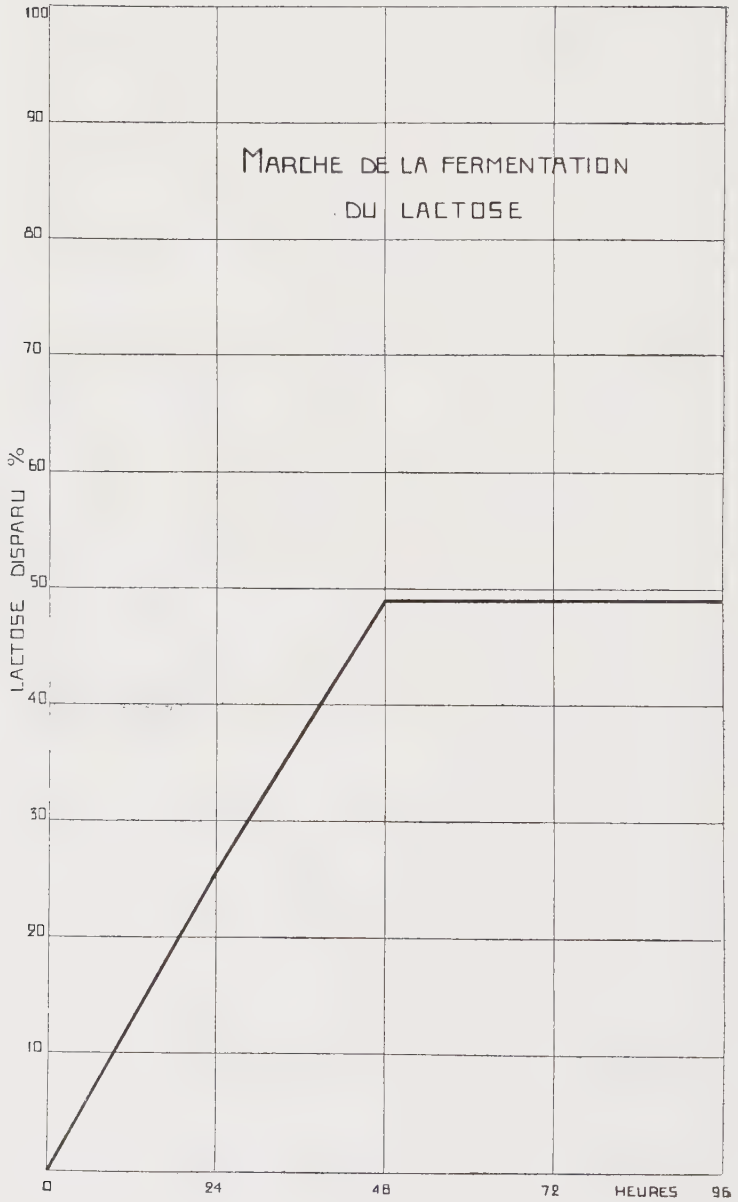
Le milieu de touraillon est employé. Chaque ballon contient :

Eau de touraillon.	50 cc 0
Peptone.	1 $\frac{0}{0}$
Carbonate de chaux.	3 $\frac{0}{0}$
Lactose	1 gr. 50

Cinq ballons ont étéensemencés avec deux gouttes d'une culture de ferment bulgare, âgée de 24 heures. Ces ballons ont été mis à l'étuve à 45°.

Voici les résultats d'analyse que donne ce milieu aux divers âges de la culture :

N ^o de Ballon	Age de la cult. h ^{res}	Dos. du lactose av. l'intersion gr.	Dos. du lactose ap. l'intersion gr.	Dosage de CO ² Ca restant gr.	CO ² Ca dissous gr.	Acide lactique formé gr.	Acidité en aci- de lactique % p. %	sucres disparus pour % p. %
témoin	—	1,097	1,57	1,45	0,02	—	—	—
I	24	0,77	1,17	1,24	0,23	0,38	26,8	25,6
II	48	0,63	0,8	1,08	0,4	0,68	43,2	49,0
III	96	0,64	0,8	1,04	0,45	0,77	49,0	49,0
IV	8 j ^{rs}	0,64	0,75	1,04	0,44	0,77	49,0	49,0



2° ACTION DU FERMENT BULGARE SUR LE SACCHAROSE.

Chaque ballon contient :

Eau de touraillon peptonisée	50 cm ³
Carbonate de chaux.	1 gr. 50
Saccharose.	1 gr. 50

Cinq ballons ont étéensemencés avec deux gouttes chacun d'une culture pure de ferment bulgare sur du lait, âgée de 24 heures, à 45°.

Les ballons ont été portés à l'étuve à 45° avec un ballon témoin nonensemencé.

J'ai obtenu, à l'analyse, les résultats suivants :

Ballons	Age de la culture	Dosage de saccharose	Dosage de CO ³ Ca restant	Dosage de CO Ca dissous	Acide lactique formé
	jours	grammes	grammes	grammes	grammes
témoin	—	—	—	—	—
I	2	1,5	1,465	—	—
II	2	1,5	1,465	—	—
III	4	1,5	1,465	—	—
III	6	1,5	1,47	—	—

3° ACTION DU FERMENT BULGARE SUR LE MALTOSÉ

Chaque ballon contient les quantités suivantes :

Eau de touraillon.	50 cm ³
Peptone.	1 %
Carbonate de chaux.	1 gr. 5
Maltose	1 gr. 5

Cinq ballons de ce milieu maltosé ont étéensemencés de deux gouttes d'une culture jeune de 24 heures sur lait stérile et mis à l'étuve à 45°, et analysés après le séjour voulu à l'étuve.

J'ai obtenu les résultats suivants :

Numéro de Ballons	Age de la culture	Dosage de sucre	Dosage de CO ₂ Ca restant	Dosage de CO ₂ Ca dissous	Acide lactique
		grammes	grammes	grammes	p. %
I	témoin	1,5	1,44	—	—
II	48 h.	1,5	1,43	—	—
III	4 j.	1,5	1,44	—	—
IV	6 j.	1,5	1,44	—	—

DISACCHARIDES

D'après ces résultats, le ferment bulgare fermente la moitié du lactose et ne touche ni au saccharose ni au maltose. Le ferment bulgare ne contient ni sucrase ni maltase, car ces sucres se dédoublent et fermentent sous la forme des hexoses auxquels ils donnent naissance. En effet, la sucrase a été signalée dans beaucoup d'espèces lactiques. La maltase a été également trouvée dernièrement par Rona ¹. Donc le fait que la transformation en acide lactique de ces deux sucres est précédée d'une

1. P. RONA, *Bioch. Zeitsch.*, **187**, 330, 1927.

hydrolyse préliminaire par les différentes diastases que le ferment contient, est très clair.

Par contre, la lactase n'a jamais été isolée chez ces ferments. Les monosacharides n'ont jamais été identifiés au cours de la fermentation. Willstatter et Oppenheimer¹, qui trouvent qu'un mélange de galactose et glucose fermente plus lentement que le lactose, constatent que l'hydrolyse préliminaire n'est pas nécessaire pour la fermentation de ce sucre. La façon par laquelle le ferment bulgare attaque le lactose a son importance, car elle donne le premier exemple d'un ferment lactique vrai qui dédouble visiblement le lactose avant la transformation en acide lactique.

La moitié de la quantité du lactose mise dans le milieu a été fermentée seulement et le microbe est mort sans transformer l'autre moitié qui est sans doute infermentescible. Le lactose a donc subi une hydrolyse, après laquelle l'hexose fermentescible a disparu, tandis que l'autre moitié qui, au polarimètre, donne les caractères du galactose reste dans le milieu. On constate ainsi que le ferment bulgare, possède une diastase, la lactase. C'est une endolactase qu'on ne peut pas trouver dans le milieu de culture filtré à travers une bougie Chamberland.

1. R. WILLSTATTER et G. OPPENHEIMER, *Zeit. f. Physiol. Chem.*, **118**, 168-188, 1922.

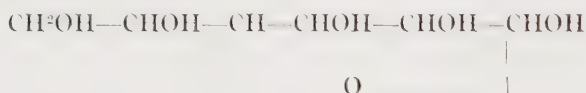
MARCHE DE LA FERMENTATION

La courbe de la marche de la fermentation de lactose, ou bien le glucose produit par l'hydrolyse de lactose est uniforme, tandis que celle qui montre la marche de la fermentation de glucose est variable avec l'âge de la culture. Il y a donc une différence entre le glucose tel qu'il se présente naturellement et celui produit par l'hydrolyse du lactose.

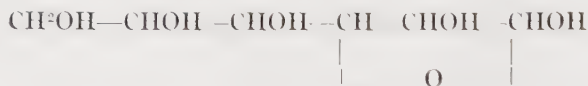
On sait que le glucose peut exister sous deux formes, l'une est la forme aldéhydique.



et l'autre qui renferme une liaison oxydique



Dans une recherche d'Irvine¹ sur la constitution stéréochimique des sucres et de leurs dérivés méthylés, il constate qu'il existe une nouvelle forme de sucre à qui il donne le terme: sucre en position γ. Ainsi le glucose aurait la structure:



1. IRVINE, *Journ. Chem. Soc.*, **123**, 898, 1923.

Le déplacement de l'oxygène de sa position normale offre au sucre des propriétés nouvelles parmi lesquelles une certaine instabilité. D'après cet auteur, ce serait sous cette forme particulièrement instable que les hexoses figureraient dans la nature, soit au cours de leur synthèse par la plante, soit pendant leur dégradation par l'organisme animal et très probablement aussi sous l'influence de l'action microbienne. Ainsi, le glucose tel qu'il existe dans la molécule du lactose est différent du glucose dont on se sert habituellement au laboratoire. Et, séparé de la molécule complexe sous l'influence d'un agent d'hydrolyse, il se stabilise aussitôt sous la forme ordinaire.

C'est donc par l'existence de ces formes de glucose qu'on peut expliquer pourquoi la marche de la fermentation de ce sucre est différente du même sucre qui revient de l'hydrolyse.

On peut expliquer le fait constaté par Willstätter et G. Oppenheimer qu'un mélange de glucose et de galactose fermente moins vite que le lactose. Les deux hexoses qui reviennent après l'hydrolyse sont plus facilement vulnérables que les deux sucres ordinaires. Ce fait ne peut être donc considéré comme une preuve que le lactose n'est pas hydrolysé avant la formation par les ferments lactiques.

CHAPITRE IV

PASSAGES SUCCESSIFS

I

PASSAGES SUCCESSIFS DANS LE MILIEU GLUCOSÉ

Chaque ballon contient:

Eau de touraillon peptonisée.	50 cc 0
Carbonate de chaux.	1 gr. 5
Glucose.	1 gr. 5

J'aiensemencé un de ces ballons avec deux gouttes d'une culture pure de ferment bulgare sur du lait, âgée de 24 heures à 45°. Je l'ai porté à l'étuve à 45° pendant 48 heures, au bout desquelles j'en ai prélevé dix gouttes que j'ai portées dans un deuxième ballon. Celui-ci a été mis à l'étuve à 45° pendant 48 heures et j'ai dosé les produits du premier. J'ai continué ainsi des passages successifs dans le même milieu.

Le but de ces essais était de voir si le ferment bulgare conserve ses propriétés biochimiques dans ce milieu avec glucose.

Les chiffres suivants ont été trouvés après analyse:

Numéro de passage	Age de la culture	Dosage du glucose	Dosage du CO_3Ca restant	Dosage du CO_3Ca dissous	Acide lactique formé p. %
	heures	grammes	grammes	grammes	p. %
témoin :	48	1,653	1,447	0,02	
I	48	0,265	0,8	0,71	72,7
II	48	1,4	1,37	0,12	12,1
III	48	0,133	0,705	0,76	78,7
IV	48	0,31	0,825	0,68	63,03
V	48	trace	0,6525	0,864	84,8

Dix gouttes du cinquième ballon coagulent le lait en 24 heures.

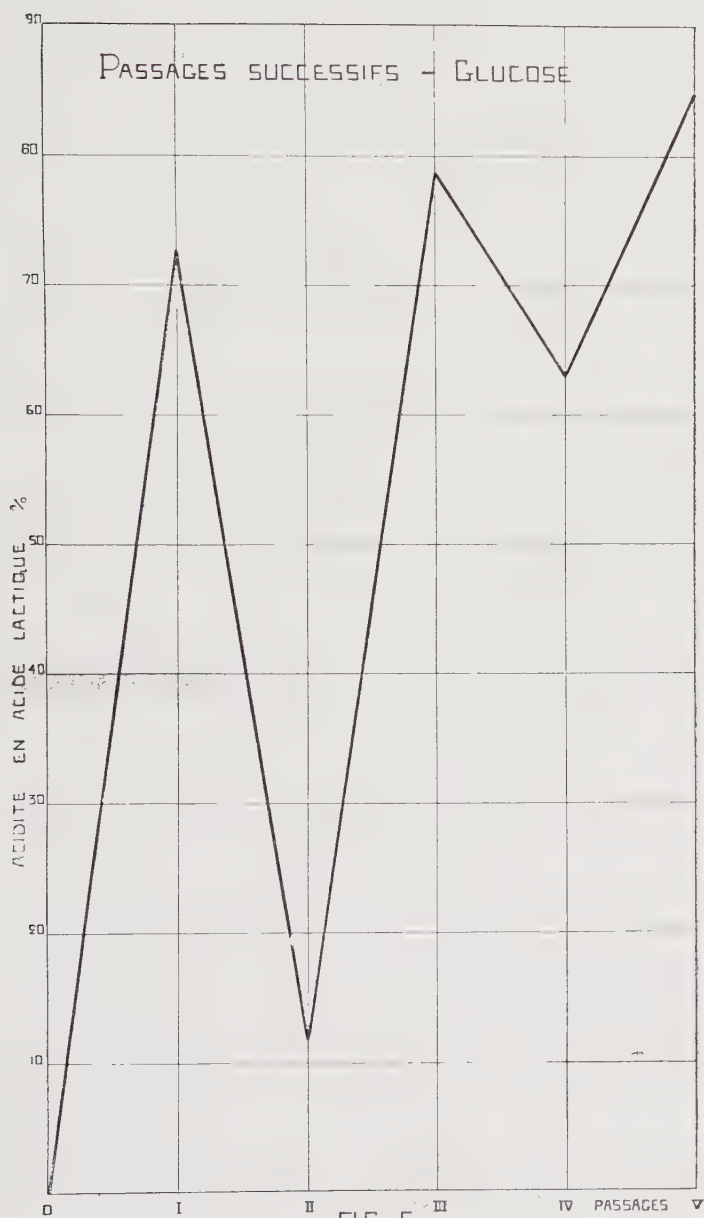


FIG. 5

PASSAGES SUCCESSIFS DANS LE MILIEU GLUCOSÉ.

La courbe de la marche de fermentation montre des variations notables de l'activité du ferment bulgare dans les différents passages. On remarque que les ballons, dont l'acidité est forte, sont suivis d'une fermentation très faible. Ainsi on trouve que l'acidité dans les ballons impairs est très forte, tandis qu'aux ballons pairs, elle est sensiblement plus faible.

Le premier ballon,ensemencé avec deux gouttes d'une culture jeune sur le lait, fermente au bout de 48 heures la plupart du glucose mis dans le milieu. On sait que l'acidification forte a lieu non pas simultanément avec le développement des bactéries, mais après le laps de temps nécessaire, à la production d'une quantité suffisante d'enzymes, c'est-à-dire après ce qu'on appelle le stade d'incubation. L'accroissement d'acidité, dans le milieu glucosé, est au début très lent, puis il augmente plus vite, comme nous l'avons déjà montré dans la marche de fermentation, avec l'âge de la culture. Mais on sait aussi que l'accroissement des bactéries atteint le maximum à l'âge de 20 heures, à 45°¹, après lesquelles les microbes commencent à mourir (étant donné que l'ensemencement est fait avec une cul-

1. Charles VAS, *le Lait*, 1924, p. 625.

ture jeune). La forte acidité dans le premier ballon indique ainsi que le nombre des germes en ce moment dans le milieu est diminué, et que le reste des bacilles bulgares est affaibli par la fermentation. Le deuxième ballon estensemencé avec dix gouttes de ce premier ballon. Cette quantité est cinq fois plus grande que la quantité employée pour l'ensemencement du premier ballon, car j'ai essayé l'ensemencement avec deux gouttes, mais le résultat de la fermentation était très faible. Pourtant cette quantité de semence ne renferme pas beaucoup de microbes, car au moment du prélèvement beaucoup de microbes sont morts dans la culture, comme nous l'avons expliqué plus haut. Ainsi le maximum de l'accroissement de ferment ne peut être atteint à la vingtième heure comme dans le premier ballon, il est beaucoup retardé. Par conséquent, l'acidité, qui est produite en général peu après le développement de bactéries, est naturellement très faible au bout de 48 heures, à 45°, tandis que la culture est immense en ce moment, et c'est pourquoi le troisième ballonensemencé avec cette culture montre une acidité très forte. On peut expliquer ainsi l'activité de la fermentation dans les autres passages.

On remarque également que l'acidité dans les ballons impairs, comme dans les ballons pairs augmente relativement avec le numéro de passage. Dans le troisième ballon, elle est plus élevée que dans le premier; dans le quatrième, elle est plus élevée que dans le deuxième. Cela montre que le ferment qui subit des passages successifs augmente

progressivement d'activité. Cela rappelle aussi le fait que certains microbes médicaux peuvent être rendus plus virulents par des passages successifs dans une série de cobayes.

II

PASSAGES SUCCESSIFS DANS LE MILIEU LACTOSÉ

Chaque ballon contient :

Eau de touraillon.	50 cc 0
Carbonate de chaux.	1 gr. 5
Lactose	1 gr. 5

J'ai procédé de la même manière qu'avec les passages successifs de glucose. La durée de la culture a été aussi de 48 heures, à 45° pour chaque ballon.

J'ai obtenu à l'analyse de chaque ballon les chiffres suivants des dosages de différents produits.

Numéro de passage	Age de la culture	Dosage du lactose interver.	Dosage du CO ² Ca restant	Dosage du CO ² Ca dissous	Acide lactique formé p. %
	heures	grammes	grammes	grammes	pour %
témoin	48	1,57	1,45	0,02	—
I	48	0,704	1,025	0,45	49
II	48	1,6	1,41	0,034	—
III	48	1,57	1,40	0,042	—
IV	48	1,61	1,43	0,04	—

1) Dix gouttes du deuxième ballon ne coagulent pas le lait.

2) Le deuxième ballon était clair, il n'y avait pas de culture.

Ces expériences montrent que le ferment est mort dans le premier ballon, car ensemencée sur du lait stérile, la culture de ce premier ballon ne coagule pas le lait. Dans le deuxième passage, le milieu était clair au bout de 48 heures à l'étuve. L'analyse a montré également qu'il n'y avait pas de fermentation, car il n'y a eu aucun changement ni dans le poids de la quantité du lactose mise dans le milieu, ni dans celui de carbonate de chaux. Les troisième et quatrième passages n'ont décelé aucun changement dans le milieu. Les microbes, après avoir transformé la totalité de la quantité de sucre fermentescible (glucose) dans le milieu, en moins de 48 heures, sont, sans doute, morts dans la culture du premier ballon. C'est ainsi que le deuxième ballon ensemencé de cette culture morte ne montre aucun développement de bactéries. En effet, on sait que la vie du ferment bulgare est impossible sans sucre fermentescible.

Mais, pour examiner la marche de la fermentation avec des passages successifs quand il y a toujours du sucre fermentescible, j'ai recommencé ces expériences avec le lactose, en diminuant le temps de séjour à l'étuve. Au lieu de laisser les ballons 48 heures à l'étuve (temps suffisant pour fermenter la totalité du glucose fourni par l'hydrolyse), je les ai laissés seulement 24 heures.

PASSAGES SUCCESSIFS DANS LE MILIEU LACTOSÉ.

J'ai procédé avec le même milieu de culture employé précédemment :

Eau de touraillon.	50 cc 0
Carbonate de chaux.	1 gr. 5
Lactose	1 gr. 5

J'ai procédé de la même manière que pour les expériences de passages successifs de glucose, mais au lieu de poser les ballons à l'étuve pendant 48 heures, je les ai laissés pendant 24 heures seulement.

Le but de ces essais était de voir si le ferment garde ses propriétés biochimiques en faisant des passages successifs dans le milieu lactosé, s'il y avait toujours du sucre fermentescible (car des expériences précédentes ont montré que le sucre fermentescible dans le milieu lactosé est disparu après 48 heures à l'étuve à 45°).

Numéro de passage	Age de la culture	Dosage du lactose	Dosage de CO ³ Ca restant	CO ³ Ca dissous	Acidité en acide lactique %
	heures	grammes	grammes	grammes	pour %
témoin	48	{ 1,57 interverti 1,47 1,1 non interverti		—	—
I	24	0,69	1,15	0,32	35,8
II	24	0,70	1,12	0,35	40,1
III	24	0,70	1,125	0,345	40,1
IV	24	0,70	1,095	0,375	43,3

Dix gouttes du quatrième ballon coagulent le lait en 24 heures.

Ces expériences ont montré que la fermentation marche dans tous les ballons. A 24 heures, à l'étuve, la totalité de la quantité du sucre fermentescible n'est pas entièrement disparue. Par conséquent, le ferment vit encore dans le milieu. En outre, pendant ce court séjour à l'étuve, les ferments montrent le maximum de leur accroissement. Il n'y a donc pas de microbes morts dans la culture au moment où l'ensemencement des ballons successifs se fait. C'est pour cela que ni le deuxième ni le quatrième ballon ne montrent de fermentation relativement très faible comme dans les passages successifs avec le glucose seul.

Les expériences de passages successifs avec le glucose et le lactose montrent les faits suivants :

1) Le milieu artificiel de touraillon est le seul milieu connu, jusqu'ici, favorable au développement du ferment bulgare, sans que celui-ci perde ses propriétés biochimiques.

2) La vie de ce ferment est impossible sans sucre *fermentescible*.

3) Le long séjour à l'étuve rend la vie de ce microbe très courte, même s'il y a toujours du sucre fermentescible dans le milieu.

4) La fermentation très forte, produite peu après l'accroissement intégral de ce ferment, l'affaiblit progressivement, puis le fait mourir, même s'il y a toujours du carbonate de chaux suffisant dans le milieu pour neutraliser l'acidité formée au cours de la fermentation.

C H A P I T R E V

RELATION ENTRE LA QUANTITÉ DU SUCRE MISE DANS LE MILIEU ET LA VITESSE DE LA FERMENTATION

Dans des tubes à essai stériles, j'ai mis les produits suivants:

Tubes	CO ³ Ca	Eau de Touraillon peptonisée	Glucose	Quantité de semences (Après la stéri- lisation du mi- lieu de culture).
	grammes	cent. cubes		gouttes
témoin	—	—	—	—
I	1,0	10,0	0,4	2
II	1,0	10,0	0,6	2
III	1,0	10,0	0,8	2
IV	1,0	10,0	1,0	2
V	1,0	10,0	1,2	2
VI	1,0	10,0	1,4	2
VII	1,0	10,0	1,6	2
VIII	1,0	10,0	1,8	2

J'ai ensemencé chaque tube avec deux gouttes d'une culture de ferment bulgare sur du lait, âgée de 24 heures, à 45°, et j'ai posé les tubes à l'étuve, à 45°, pendant 48 heures.

J'ai dosé ensuite le carbonate de chaux dans chaque tube et j'ai calculé l'acide lactique formé d'après le carbonate de chaux dissous.

OBSERVATION

N° des tubes	Quantité de sucre	Examen de la culture in vitro		Action sur le lait après 48 heures à 45°.	Examen microscopique de la culture après 48 h. à 45°
		après 24 h.	après 48 h.		
tém.	—	milieu clair	milieu clair	ne coagule pas le lait	
I	0,4	— uniformément troublé.	— uniformément troublé.	coagule le lait	Bacilles bulgare vivants
II	0,6	»	»	»	»
III	0,8	»	»	»	»
IV	1,0	très légèrement troublé	»	»	»
V	1,2	milieu clair	milieu clair	ne coagule pas le lait	Pas de microbes
VI	1,4	»	»	»	»
VII	1,6	»	»	»	»

Voici les dosages du carbonate de chaux et de l'acide lactique calculé dans cette série d'expériences :

Numéro des tubes	Quantité de glucose	Dosage du CO ² Ca restant	Carbonate de chaux dissous	Acidité en acide lactique
	grammes	grammes	grammes	grammes
témoin	—	—	—	—
I	0,4	0,975	—	—
II	0,6	0,8055	0,1695	0,306
III	0,8	0,8025	0,1725	0,311
IV	1,0	0,8055	0,1695	0,306
V	1,2	0,845	0,1300	0,234
VI	1,4	0,975	—	—
VII	1,6	0,975	—	—
VIII	—	—	—	—

L'activité de la fermentation dépend de la concentration du milieu en sucre. On déclare que l'acidité est proportionnellement plus élevée dans les milieux moins sucrés. La dose optima du sucre pour tous les autres ferments lactiques est comprise entre 0,5 à 2 %¹.

D'après ces expériences, toutes conditions de culture, de température, de séjours à l'étuve et de quantité de semence étant identiques, alors que la quantité de sucre mise au milieu est progressivement plus élevée, on constate que, pour le ferment bulgare, la dose du sucre la plus favorable est 6 %. L'activité diminue progressivement, lorsqu'on augmente de même cette dose.

1. KAYSER, *le Lait*, 1, 190, 1921.

On constate également que jusqu'à 10 % du sucre dans le milieu, on a toujours un développement de ferment bulgare. Une dose plus élevée rend impossible la végétation de ce ferment. Donc, 12 % du sucre dans le milieu est une dose qui peut être considérée comme antiseptique pour le ferment bulgare.

CHAPITRE VI

LA RELATION ENTRE LA VITESSE DE LA FERMENTATION ET LA QUANTITÉ DE SEMENCE

Chaque ballon, dans cette série d'expériences, contient :

Eau de touraillon peptonisée	50 cc
Carbonate de chaux	1 gr. 50
Glucose	1 gr. 50

J'aiensemencé d'une culture de 24 heures de ferment bulgare sur du lait, de la façon suivante :

1 ^{er} ballon	2 gouttes
2 ^e —	4 —
3 ^e —	8 —
4 ^e —	16 —
5 ^e —	32 —

J'ai placé les ballons à l'étuve, à 45°, pendant 24 heures après lesquelles j'ai dosé le carbonate de chaux dans chaque ballon et calculé l'acide lactique formé.

Voici les résultats :

Ballons	Quantité de semence	Age de la culture	Dosage du CO^3Ca	CO^3Ca dissous	Acide lactique formé	Acidité en acide lactique
	gouttes	heures	grammes	grammes	grammes	p. %
témoin	—	—	—	—	—	—
I	2	24	1,46	—	—	—
II	4	24	1,43	0,03	0,05	3,4
III	8	24	1,41	0,05	0,09	6,2
IV	16	24	1,15	0,31	0,58	39,7
V	32	24	1,02	0,44	0,79	54,0
				0,44	0,79	54,0

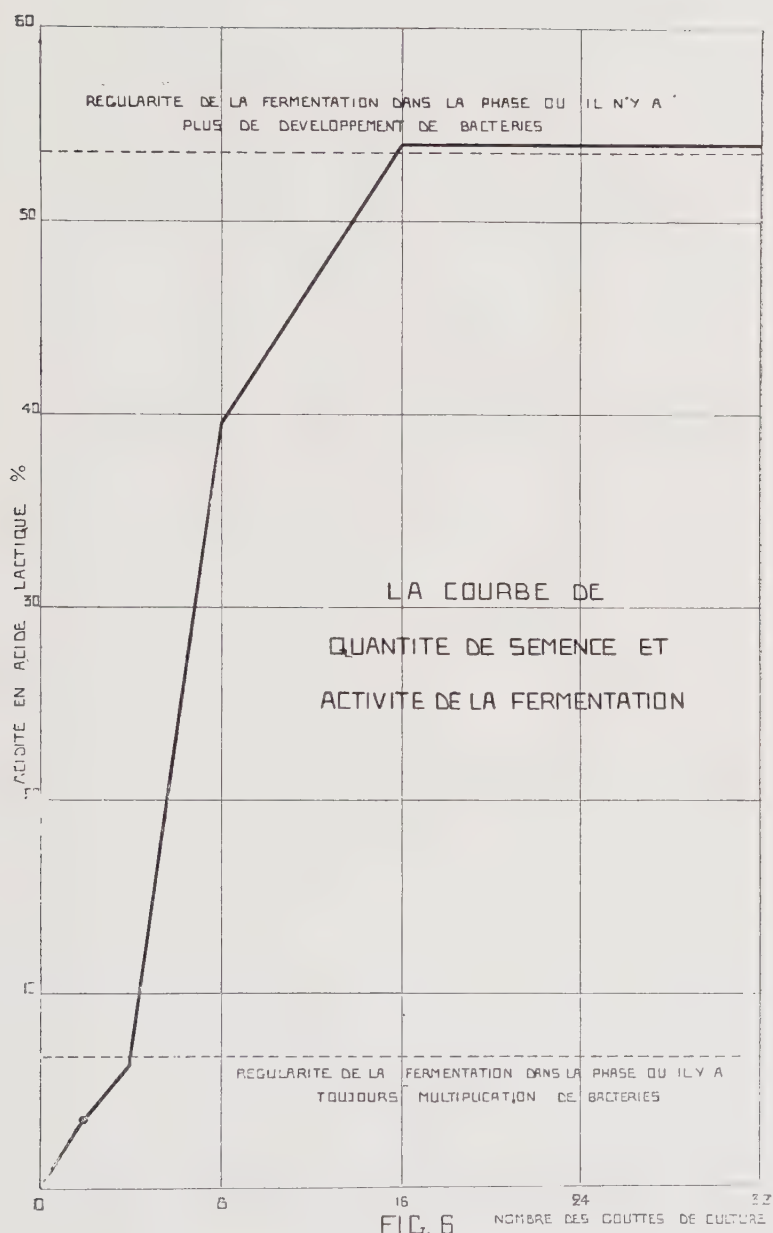


FIG. 6

NUMBRE DES GOUTTES DE CULTURE

D'après ces expériences, on constate que:

1) La fermentation est deux fois plus active dans le deuxième ballon que dans le premier.

2) Elle est presque six fois plus forte dans le troisième que dans le deuxième.

3) L'acidité formée est constante dans les deux derniers ballons.

On sait qu'il y a deux phases principales dans l'activité de la fermentation:

a) La première phase est celle de l'activité microbienne au moment de la multiplication des germes,

b) La deuxième commence lorsque la multiplication ne peut plus se faire. Dans cette phase, l'activité des germes devient relativement plus grande que dans la première.

Les deux premiers ballons sont considérés comme faisant partie de la première phase où la multiplication se fait continuellement durant les 24 heures. Ayantensemencé dans le deuxième ballon une quantité double de germes par rapport au premier, on obtient de même une acidité double. On constate ainsi que:

1) L'activité du ferment bulgare, dans la première phase, est en relation étroite avec l'accroissement des bactéries;

2) Que cette activité est constante dans la première phase.

Quant à l'activité de la fermentation, dans le troisième ballonensemencé avec une quantité de semence double par rapport au deuxième ballon,

elle ne suit pas la même proportion. Elle est relativement très grande (six fois au lieu de deux). C'est que, dans ce ballon, le maximum de développement des bactéries est atteint à un moment donné avant la fin des 24 heures. Ainsi l'activité du ferment dans ce troisième ballon est donc considéré comme appartenant à la fois à la première et à la deuxième phase. Mais, comme cette activité n'est pas la même dans ces deux phases (car elle est beaucoup plus forte dans la deuxième que dans la première), elle ne peut pas suivre la même proportion, dans ce ballon, que dans les deux premiers.

Dans les deux derniers ballons, malgré une quantité double de semence dans l'un par rapport à l'autre, l'activité a été exactement la même à la fin des 24 heures. Il faut admettre que lorsqu'onensemence largement, la multiplication des bactéries se fait si rapidement qu'on peut considérer, comme négligeable, la différence entre la vitesse de la fermentation dans la première phase (qui est d'ailleurs très courte) et la deuxième. Ainsi l'activité de la fermentation dans ces deux ballons appartient à la deuxième phase. Mais, comme l'acidité, dans ces deux ballons, est constante, on conclue :

1^o que l'activité de la fermentation est constante dans la deuxième phase ;

2^o qu'à partir d'une certaine quantité de semence, qui doit être assez grande pour que la multiplication des bactéries s'achève très rapidement, et au bout d'un temps déterminé, l'acidité produite reste constante même si l'on augmente la quantité de semence.

On a vu que l'activité de la fermentation par le ferment bulgare est constante et en relation étroite avec la quantité de semence dans la première phase. On a vu également qu'elle est constante dans la deuxième phase. On constate donc que la fermentation est régulière par le ferment bulgare, et ne montre pas les variations qu'ont déterminées plusieurs auteurs chez d'autres espèces de ferments lactiques.

CONCLUSION

Le ferment bulgare est un producteur puissant d'acide lactique. Il est très difficile à cultiver sans perdre ses propriétés biochimiques, en dehors du lait. Le milieu au touraillon est le seul milieu artificiel qui lui soit favorable. La vie de cette bactérie, qui est très courte, est prolongée par l'addition, au milieu, de carbonate de chaux. Ce ferment exige la présence du sucre fermentescible dans le milieu.

Parmi les hémicosides, ce ferment attaque le glucose, le lévulose et le mannose. La facilité de cette attaque ainsi que la marche de la fermentation sont différentes avec ces trois sucres. Quant au galactose, même en présence d'un autre sucre fermentescible, il résiste complètement à la transformation. Aussi, le ferment bulgare, qui a été traité auparavant avec du galactose, ne fermente pas ce sucre.

Les expériences des pentoses montrent l'inférentescibilité de ces sucres.

Parmi les dissaccharides, le lactose subit une hydrolyse — en glucose et galactose — après laquelle le glucose disparaît, tandis que le galactose reste intact dans le milieu. La vitesse et la marche de la fermentation du glucose tel qu'il se trouve dans la

molécule de lactose, ne ressemblent point à celles du glucose ordinaire dont on se sert habituellement au laboratoire. Les deux glucoses ne possèdent donc pas les mêmes propriétés.

Ce ferment ne touche ni au saccharose ni au maltose.

Au point de vue diastase le bacille bulgare ne contient ni sucrase, ni maltase, mais il possède une lactase qui n'est pas sécrétée dans le milieu de culture. Ce ferment donne ainsi le premier exemple d'une bactérie lactique vraie qui dédouble visiblement le lactose.

L'activité de la fermentation dans la première phase (au moment du développement des microbes) est en relation étroite avec la quantité de semence. Cette activité est, aussi, constante dans chacune des phases de la fermentation et ne montre pas l'irrégularité trouvée chez certaines espèces de ferments lactiques.

BIBLIOGRAPHIE

- N. ABELLES. — Zur Kenntniss der Toxizität der hexosediphosphorsaure (*Biochem. Zeitschr.*, **163**, 227, 1925).
- E. AUBEL. — Sur le métabolisme microbien de l'acide lactique et de l'acide pyruvique (*C. R. Ac. des sciences*, **176**, 332, 1923).
- Eudoxi-Dwocha BACHRACH. — Variation biologique d'un organisme monocellulaire: accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique (*Thèse ès-sciences*, Paris 1924).
- G. BERTRAND et DUCHACEK. — Action du ferment bulgare sur les principaux sucres (*Annal. Inst. Pasteur*, p. 402, 1909; *Biochem. Zeitsch.*, **20**, 100, 1909).
- G. BERTRAND et WEISVEILLER. — Action du ferment bulgare sur le lait (*Ann. Inst. Pasteur*, p. 977, 1906).
- E. BUCHNER. — Studien über den Phosphorgehalt der Hefe und einiger Hefepräparate (*Biochem. Zeitschr.*, **27**, 418, 1910).
- H. CARDOT et Ch. RICHEL. — Hérité, accoutumance et variabilité dans la fermentation lactique (*Annal. Inst. Past.*, **33**, 575-615, 1919).
- H. CARDOT. — Sur l'irrégularité des ferments lactiques. Quelques remarques sur les critiques de M. L. Lumière. (*Ann. Inst. Pasteur*, **37**, 988, 1923).
- H.-D. DAKIN et H.-W. DUDLEY. — The formation of methylglyoxal from glucose (*Journ. biol. chem.*, **15**, 135, 1913).
- An enzyme concerned with the formation of hydroxyacids from Ketonic aldehyde (*Journ. biol. chem.*, **14**, 155, 1913).
- On glyoxalase (*Ibidem*, p. 423).
- H.-D. DAKIN. — Über « Glyoxalase » ein enzym das milchsäure aus methylglyoxal bildet (*Biochem. Zeitsch.*, **59**, 193, 1914).

- H.-V. EULER. — Ueber die Darstellung von Kolenhydrat-phosphorsäureester (Zymophosphat) durch lebende Hefe (*Biochem. Zeitsch.*, **86**, 337, 1918).
- H.-V. EULER et H. OIHSEN. — Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Wirkung der Phosphater (*Ibidem.*, **37**, 313, 1911).
- Ueber die Wirkungsweise der phosphatase (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **76**, 468, 1912).
- A. FERNBACH. — Sur la dégradation biologique des hydrates de carbone (*C. R. Ac. des Sciences*, **151**, 1004, 1910).
- A. FERNBACH et M. SCHÆN. — Sur la production du lévulose par voie biochimique (*C. R. Ac. des Sciences*, **155**, 84, 1912).
- E. FISCHER. — Bedeutung der stereochemie für die Physiologie (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **26**, 60, 1898).
- Cl. FROMAGEOT. — Über den Kohlenhydratablau durch *Bacterium Coli*. Die Isolierung von methylglyoxal (*Biochem. Zeitschr.*, **216**, 467, 1929).
- A. HARDEN et R. ROBISON. — A new phosphoric ester obtained by the aide of yeast juice (*Proc. Chem. Soc.*, **30**, 16, 1914).
- A. HARDEN et W. YOUNG. — The formation of phosphates in the fermentation of glucose by yeast juice (*Proc. Roy. Soc.*, **80**, 229, 1908).
- The fermentation of glucose, mannose and fructose by yeast juice (*Proc. Roy. Soc.*, **81**, 336, 1909).
- Function of phosphates in alcoholic fermentation (*Proc. Roy. Soc.*, **82**, 321, 1910).
- J.-C. IRVINE. — Some constitutional problems of Carbohydrate Chemistry (*Journ. Chem. Soc.*, **123**, 898, 1923).
- L. IWANOFF. — Über die Synthese der phosphororganischen Verbindungen in algetotetem Hefezellen (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **50**, 281, 1906-07).
- E. KAYSER. — Contribution à l'étude de la fermentation lactique (*Thèse*, 1894).
- Les ferments lactiques (*Le Lait*, **1**, p. 184, 242, 1921).
- Auguste LUMIÈRE. — Sur la régularité de la fermentation lactique (*Ann. Inst. Pasteur*, **37**, 997, 1923).

- Auguste LUMIÈRE. — A propos des irrégularités de la fermentation lactique en présence de certains antiseptiques (*C. R. Acad. des Sciences*, **178**, 258, 1924).
- Sur la variabilité de la fermentation lactique (*Annal. Inst. Pasteur*, **38**, 344, 1924).
- O. MEYERHOF. — Beobachtung über die methylglyoxalase (*Biochem. Zeitschr.*, **159**, 432, 1925).
- C. NEUBERG. — Ueber die Zerstörung von Milchsäurealdehyd und methylglyoxal durch tierische Gewebe (*Biochem. Zeitschr.*, **49**, 502, 1913).
- Ueberführung der Fructose diphosphorsäure in fructose-monophosphorsäure (*Biochem. Zeitschr.*, **88**, 432, 1918).
- C. NEUBERG, E. FAERBER, A. LEVITE et E. SCHWENK. — Ueber die hexosephosphorsäure (*Bioch. Zeitschr.*, **83**, 244, 1917).
- C. NEUBERG et G. GORR. — Über den mechanismus der Milchsäurebildung bei Bakterien (*Bioch. Zeitsch.*, **162**, 490, 1925).
- C. NEUBERG et W. CERTEL. — Studien über methylglyoxalbildung (*Biochem. Zeitsch.*, **55**, 495, 1913).
- C. NEUBERG et G. GORR. — Von Milchsäure durch verschiedene Bakterien, die methylglyoxal dismutieren und über eine einfache art der isolierung von lactat (*Biochem. Zeitsch.*, **173**, 476, 1926).
- C. NEUBERG et G. GORR. — Über Mechanismus der Milchsäurebildung bei Bakterien (*Biochem. Zeit*, **162**, 490, 1925).
- Über den Mechanismus der Milchsäurebildung bei Phanerogamen (*Biochem. Zeitschr.*, **171**, 475, 1926).
- Untersuchungen über den mechanismus der Milchsäurebildung bei Phanerogamen (*Biochem. Zeitsch.*, **173**, 358, 1926).
- C. NEUBERG et M. KOBEL. — Dei Isolierung von methylglyoxal bei der Milchsäuregarung (*Biochem. Zeitsch.*, **207**, 232, 1929).
- Neue verchudenen über die vergarung von hexosephosphorsäure (*Biochem. Zeitsch.*, **174**, 480, 1926).
- J. U. NEF. — Dissociationsvorgänge in der Glycol-Glycerinreihe (*Leibigs Annalen*, **335**, 191, 1904).

- J. U. NEE. — Dissociationvorgänge in der Zuckergruppe (ibidem, **357**, 214, 1907).
- Ch. RICHET. — Adaptation des microbes (ferment lactique) au milieu (*Annal. Inst. Pasteur*, **29**, 22, 1915).
- R. ROBISON. — The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification (*Bioch. Journal*, **17**, 286, 1923).
- A new phosphoric ester produced by the action of yeast juice on hexoses (*Bioch. Journal*, **16**, 809, 1922).
- P. RONA, D. NACHMANSOHN et H.-W. NICOLAI. — Über den Fermentstoffenechsel der Bakterien (*Biochem. Zeitschr.* **187**, 328, 1927).
- M. SCHÆN. — *Le problème des fermentations*, Paris, 1926.
- L.-J. SIMON. — Sur la constitution du glucose (*C. R. Acad. des Sciences*, **132**, 487, 1901).
- W.-J. YOUNG. — The hexosephosphate formed by yeast juice from hexose and phosphate (*Proc. Roy. Soc.*, **81**, 528, 1909).
- CH. VAS. — Formation d'acide en symbiose du bactérie bulgare et du streptococcus lactis dans le yougourt (*Le Lait*, p. 625, 1924).

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. — Généralités	
I. Milieu de culture (pour le ferment bulgare).	7
II. Propriétés du ferment bulgare	12
III. Produits de la fermentation par le ferment bulgare	16
CHAPITRE II. — Procédés des expériences	
I. Préparations du milieu employé pour les recherches	21
II. Méthodes d'analyses	24
CHAPITRE III. — Action du ferment bulgare sur les	
sucres.	29
I. Action sur les hexoses.	31
a) Action sur le Glucose	31
b) — — Lévuiose.	34
c) — — Mannose.	36
d) — — Galactose	38
Mécanisme de la fermentation lactique .	45
Dégradation des sucres	52
Fermentescibilité des hexoses.	56
II. Action sur les pentoses	61
a) Action sur le xylose	64
b) — — l'arabinose.	65

III. Action sur les disaccharides.. . . .	67	
a) Action sur le lactose	67	
b) — la saccharose	69	
c) — le maltose	69	
CHAPITRE IV. — Passages successifs		
I. Glucose	75	
II. Lactose	81	
CHAPITRE V. — Relations entre la quantité du sucre mise dans le milieu et la vitesse de la fer- mentation		85
CHAPITRE VI. — La relation entre la vitesse de la fermentation et la quantité de semence . . .		89
CONCLUSION.		95
BIBLIOGRAPHIE		97

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

LA RATE

VU ET APPROUVÉ :

CL. FROMAGEOT,

H. CARDOT,

E. BACHRACH.

LU ET APPROUVÉ :

*Le Doyen de la Faculté des
Sciences de Lyon,*

V. GRIGNARD

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 28 mai 1930.

*Le Recteur
Président du Conseil de l'Université*

JOSEPH GHEUSI.

